

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Entwicklung eines metabolisch stabilen
Ribozyms gegen die mRNA des
Parathormon-verwandten Proteins (PTHrP)**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Martin Schultz

aus Neubrandenburg

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dietel
2. Prof. Dr. Hölzel
3. Prof. Dr. rer. nat. Sczakiel

Datum der Promotion: 9. Oktober 2001

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	5
TABELLENVERZEICHNIS	6
ABSTRACT	8
1 EINLEITUNG.....	9
1.1 KREBS UND PTHRP	9
1.2 RIBOZYME IM EINSATZ GEGEN KREBSZELLEN	10
2 MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 MATERIAL	14
2.1.1 Chemikalien, Hersteller und Bezugsquellen.....	14
2.1.2 Puffer und Lösungen.....	16
2.1.3 Verbrauchsmaterial.....	17
2.1.4 Geräte.....	17
2.1.5 Software.....	18
2.1.6 Tumorzellen.....	19
2.1.7 Ribozyme.....	20
2.1.8 Antisense-Oligonukleotid.....	22
2.2 METHODEN	22
2.2.1 Zellkultur	22
2.2.2 Herstellung der Substrat-RNA und der reinen RNA-Ribozyme	23
2.2.3 5'-Endmarkierung	28
2.2.4 Ribozymkinetik.....	29
2.2.5 Stabilitätstest	32
2.2.6 Transfektion.....	33
2.2.7 Behandlung der Zellen.....	34
2.2.8 Enzyme-linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)	35
2.2.9 Statistik	37
3 ERGEBNISSE.....	38
3.1 HERSTELLUNG DER RNA-RIBOZYME UND DER SUBSTRAT-RNA.....	38
3.2 RIBOZYMKINETIK.....	39
3.2.1 Katalytische und nicht katalytische Variante des Hammerhead-Ribozyms	40
3.2.2 Verkürzung der Stammschleife und der Flankenlängen	41
3.2.3 Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die katalytische Aktivität des Ribozyms Rb8/12	42

3.2.4	<i>RNA-DNA-Ribozyme</i>	44
3.2.5	<i>Modifizierung mit Phosphorothioaten</i>	46
3.2.6	<i>Modifizierung mit Phosphorothioaten und Basenaustausch</i>	48
3.2.7	<i>Kationisches Lipid</i>	49
3.2.8	<i>Kontrollribozym RbSSc</i>	50
3.3	STABILITÄTSTEST	50
3.4	TRANSFEKTION	51
3.5	BEHANDLUNG DER ZELLEN	52
3.5.1	<i>Ribozym RbS und RbSSc</i>	52
3.5.2	<i>Antisense-Oligonukleotid</i>	54
4	DISKUSSION	56
4.1	SUBSTRAT-RNA UND RNA-RIBOZYME	56
4.2	RIBOZYMKINETIK	58
4.2.1	<i>Das Hammerhead-Ribozym RbO</i>	61
4.2.2	<i>Verkleinerung des Hammerhead-Ribozyms</i>	62
4.2.3	<i>Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die katalytische Aktivität des Ribozyms Rb8/12</i>	65
4.2.4	<i>RNA-DNA-Ribozyme</i>	68
4.2.5	<i>Modifizierung mit Phosphorothioaten</i>	71
4.3	STABILITÄTSTEST	73
4.4	TRANSFEKTION	74
4.5	BEHANDLUNG DER ZELLEN	75
4.6	AUSSAGEN	76
5	ZUSAMMENFASSUNG	78

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: ALTERNATIVES SPLEIßEN DER PTHRP-MRNA.	10
ABB. 2: HAMMERHEAD-RIBOZYM.	12
ABB. 3: HAMMERHEAD-RIBOZYM RbO.	20
ABB. 4: PRINZIP DES ONE-SITE-ELISA.	35
ABB. 5: DNA-TEMPLATE FÜR SUBSTRAT-RNA.	38
ABB. 6: DNA-TEMPLATES FÜR RIBOZYME.	38
ABB. 7: IN-VITRO-TRANSKRIPTION.	39
ABB. 8: SPALTUNG DER SUBSTRAT-RNA DURCH DIE RIBOZYME RbO UND RbM.	40
ABB. 9: VERGLEICH DER RIBOZYME RbO UND RbM.	41
ABB. 10: VERGLEICH DER RIBOZYME RbO, Rb8/12, Rb5/10 UND Rb4/8.	42
ABB. 11: AUSWERTUNG DES VERGLEICHS DER RIBOZYME RbO, Rb8/12, Rb5/10 UND Rb4/8.	42
ABB. 12: EINFLUSS DER REAKTIONSBEDINGUNGEN AUF DIE AKTIVITÄT DES RIBOZYMS Rb8/12.	43
ABB. 13: ERSTER VERGLEICH DNA-MODIFIZIERTER RIBOZYME.	44
ABB. 14: ZWEITER VERGLEICH DNA-MODIFIZIERTER RIBOZYME.	45
ABB. 15: AUSWERTUNG DER ABBILDUNG 13 UND 14.	46
ABB. 16: MODIFIKATIONEN DES RIBOZYMS Rb8/12V4.	47
ABB. 17: AUSWERTUNG DER ABBILDUNG 16.	47
ABB. 18: VERGLEICH DER RIBOZYME RbO UND RbS.	48
ABB. 19: AUSWERTUNG DER ABBILDUNG 18.	49
ABB. 20: EINFLUSS EINES KATIONISCHEN LIPIDS AUF DIE AKTIVITÄT DES RIBOZYMS RbS.	49
ABB. 21: VERGLEICH DES KONTROLLRIBOZYMS RbSSC MIT DEM STABILISIERTEN RIBOZYM.	50
ABB. 22: STABILITÄT VON RbO UND RbS IM SERUM.	51
ABB. 23: AUSWERTUNG DER ABBILDUNG 22.	51
ABB. 24: TRANSFEKTION.	52
ABB. 25: BEHANDLUNG MIT DEM RIBOZYM RbS UND DEM KONTROLLRIBOZYM.	53
ABB. 26: BEHANDLUNG MIT ERHÖHTEN RIBOZYM- UND LIPIDKONZENTRATIONEN.	53
ABB. 27: BEHANDLUNG MIT DEM RIBOZYM RbS UND DEM ANTISENSE-OLIGONUKLEOTID.	54
ABB. 28: BEHANDLUNG MIT HOHEN ANTISENSE-OLIGONUKLEOTID-KONZENTRATIONEN.	55
ABB. 29: MICHAELIS-MENTEN-KINETIK.	59
ABB. 30: RIBOZYMÜBERSICHT I.	63
ABB. 31: RIBOZYMÜBERSICHT II.	69
ABB. 32: RIBOZYMÜBERSICHT III.	72

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: RIBOZYMSEQUENZEN.	21
TABELLE 2: SEQUENZEN DER VERWENDETEN PCR-PRIMER UND DNA-TEMPLATES	23
TABELLE 3: PCR-REAKTIONSANSATZ	25
TABELLE 4: DNA-TEMPLATES UND PRIMER-DNA DER KLENOW-ENZYM-REAKTION.	26
TABELLE 5: REAKTIONSANSATZ ZUR ZWEITSTRANGSYNTHESE	26
TABELLE 6: REAKTIONSANSATZ ZUR IN-VITRO-TRANSKRIPTION.....	27
TABELLE 7: REAKTIONSANSATZ ZUR 5'-ENDMARKIERUNG	28
TABELLE 8: REAKTIONSANSATZ ZUR SUBSTRATSPALTUNG	29
TABELLE 9: EINFLUSS VON FLANKENLÄNGE UND DNA-GEHALT AUF DIE KINETISCHEN PARAMETER.	70

Abkürzungen

ACTH	adrenocorticotropes Hormon
ADH	antidiuretisches Hormon
ASO	Antisenseoligonukleotid
as-ssDNA	gegenläufige einsträngige Desoxyribonukleinsäure (antisense single stranded deoxyribonucleic acid)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (double stranded deoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked-Immuno-Sorbent-Assay
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
IgG	Immunglobulin G
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PNK	Polynukleotidkinase
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathormon-verwandtes Protein (parathyroid hormone-related protein)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
SA-POX	Streptavidin-Peroxidase
SDS	n-Dodecylhydrogensulfat
ssDNA	einsträngige Desoxyribonukleinsäure (single stranded deoxyribonucleic acid)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer

Abstract

Mit der Entdeckung der katalytischen Aktivität von Ribonukleinsäuren wurde begonnen, darauf basierende therapeutische Strategien zu entwickeln, die auf genetischer Ebene den Stoffwechsel oder virale Infektionen von Zellen beeinflussen. Entsprechende Oligoribonukleotide waren befähigt, spezifisch RNA-Stränge zu erkennen und zu spalten. In Analogie zu Enzymen wurden sie als Ribozyme bezeichnet.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines metabolisch stabilen Hammerhead-Ribozyms. Dieses sollte lipidvermittelt in die Zellen des Nierenzellkarzinoms RCC 95/96 transfiziert werden und dort die Genexpression des dem Parathormon verwandten Proteins (PTHrP) durch die Spaltung der PTHrP-mRNA unterdrücken. Ausgangspunkt der Entwicklung war das Hammerhead-Ribozym RbO. Es wies in zellfreien Versuchen bei der Spaltung einer 232 Basen langen Substrat-RNA mit einem $k(\text{obs})$ -Wert von $47,42 \text{ E-3 /min}$ eine zur Literatur vergleichbar hohe Aktivität auf, jedoch zeigte es sich als reiner RNA-Strang gegenüber Nukleasen sehr fragil. Das Endprodukt der in mehreren Schritten abgelaufenen Weiterentwicklung des Ribozyms RbO stellte das Ribozym RbS dar. Im Vergleich zum Ausgangsribozym bestand das in der Stammschleife verkürzte Ribozym zu 71 % aus DNA. Es besaß Phosphorothioatmodifikationen in den Flanken und in den konservierten Sequenzbereichen. Zudem war durch einen Basenwechsel im katalytischen Teil der Stammschleife eine Pyrimidinbase durch eine Purinbase ausgetauscht worden. Zusammen bedingten die genannten Veränderungen eine Steigerung der Ribozymstabilität um mehr als das Zehnfache. Dabei war die katalytische Aktivität des Ribozyms RbS mit einem $k(\text{obs})$ -Wert von $45,76 \text{ min E-3 /min}$ gegenüber RbO annähernd identisch.

Das schrittweise Vorgehen bei der Ribozymentwicklung mit dem Erstellen von 20 unterschiedlich modifizierten Ribozymen ermöglichte es, den Einfluss einzelner Modifikationen auf die Ribozymaktivität zu prüfen. Mehrfach konnten dabei die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen bestätigt werden. So wurde erkannt, dass für viele Modifikationen, wie Ribozymverkleinerung, RNA-DNA-Basenaustausch und Phosphorothioateinbindung, die Auswirkung auf die katalytische Aktivität nur begrenzt vorherzusagen ist und optimale Ergebnisse nur durch Testreihen zu erlangen sind.

Bei der Behandlung der Tumorzellen in Monolayer-Zellkultur ließ sich für das Ribozym RbS keine signifikante Wirkung nachweisen. Als Ursache dafür ist am ehesten die auf Grund von Sekundärstrukturen fehlende Erkennung der Zielsequenz innerhalb der PTHrP-mRNA anzunehmen.

The development of therapeutic strategies affecting cellular metabolism and viral infections of cells was introduced after the discovery of the catalytic activity of ribonucleic acid. Appropriate oligoribonucleotides were able to specifically recognize and cleave RNA strands. They were called ribozymes by analogy with enzymes.

The main task of our research was the development of a metabolic stable hammerhead ribozyme. The ribozyme should be transfected by lipid mediated transport into renal carcinoma cells RCC 95/96 where it should suppress the gene expression of parathormone-related peptide (PTHrP) by means of cleavage of the PTHrP mRNA. The hammerhead ribozyme RbO was the starting point of the development. Its activity in cleavage of 232 base long substrates in cell-free tests was comparable to the literature ($k(\text{obs})$ value $47,42 \text{ E-3 /min}$). However it was very fragile regarding nucleases. The end product of the gradual further development of the ribozyme RbO was the ribozyme RbS. This ribozyme which was shortened in helix 2 consisted of 71 percent DNA in comparison to the original one. It was modified with phosphorothioates in helix 1 and 3 and in the conserved sequence regions. Furthermore a pyrimidine base was exchanged for a purine base in the catalytic part of helix 2. Altogether the named alterations increased the stability of the ribozyme more than 10 times. The catalytic activity of the ribozyme RbS compared to RbO was approximately identical ($k(\text{obs})$ value $45,76 \text{ E-3 /min}$).

The step-by-step development of the ribozymes with the creation of 20 different modified ribozymes made it possible to study the impact of individual modifications on the ribozyme activity. Often the results of other research groups were confirmed. Thus it was detected that the effects of some modifications like ribozyme reduction, RNA-DNA base exchange and phosphorothioates integration are only partly predictable. Therefore optimal results are only obtained by a number of tests.

Finally we could not demonstrate a significant effect of the ribozyme RbS in the treatment of tumor cells in monolayer. The most likely explanation for this seems to be that the target sequence inside of the PTHrP-mRNA wasn't recognized due to secondary structures.

1 Einleitung

1.1 Krebs und PTHrP

Krebserkrankungen stellen die zweithäufigste Todesursache dar. Der Verlauf der Krebserkrankungen wird in erster Linie durch die direkten Tumorfolgen geprägt. Hierzu gehören im Rahmen der lokalen Invasion und Metastasierung die Infiltration, Destruktion und Arrosion benachbarter Strukturen und entfernter Organe. Daneben können tumor-assoziierte Krankheitserscheinungen, die weder auf Metastasierung oder Tumorerkrankung zurückzuführen sind, den Krankheitsverlauf wesentlich mitbestimmen. Solche Krankheitserscheinungen werden als paraneoplastisches Syndrom bezeichnet und schließen neben seltenen Krankheiten des ZNS (Leukenzephalitis) und der Haut (Acanthosis migrans) insbesondere die endokrinen paraneoplastischen Syndrome ein. Sie können den klinisch nachweisbaren Tumoren vorangehen und somit die initiale Symptomatik einer Krebserkrankung darstellen. Häufiger stellen sie jedoch eine Komplikation im Verlauf der Krebserkrankung dar, die nicht selten den Beginn des Finalstadiums markiert.

Zu den Substanzen, die endokrine paraneoplastische Syndrome bedingen, gehört neben dem adrenokortikotropen Hormon (ACTH), dem antidiuretischen Hormon (ADH) und einigen anderen Hormonen das Parathormon-verwandte Protein, PTHrP (parathyroid hormone-related protein).

Im Zusammenhang mit der tumor-assoziierten Hyperkalzämie wurde schon früh der Einfluss des Parathormons oder eines Hormons vergleichbarer Wirkung diskutiert (Albright 1941). Nachgewiesen wurde das PTHrP 1987 von drei voneinander unabhängigen Forschungsgruppen (Burtis et al. 1987, Moseley et al. 1987, Stewler et al. 1987). In den nächsten Jahren klärten Broadus et al. (1988) und Martin et al. (1989) die Struktur des Proteins. Das PTHrP-Gen wurde 1989 auf dem Chromosom 12 lokalisiert. Es ist annähernd 15 Kilobasen lang und besteht aus sieben Exons und fünf Introns (Mangin et al. 1989). Durch alternatives Spleißen resultieren vier mRNA-Typen (Abb. 1) (Ikeda et al. 1988, Yasuda et al. 1989). Die Untersuchung von mehr als zwanzig verschiedenen Krebszellarten zeigte, dass nahezu alle Zelllinien alle vier mRNA-Typen erzeugen (Brandt et al. 1994, Nakamura et al. 1995). Ein Rezeptor, der die Wirkung des PTHrP vermittelt, konnte 1992 kloniert werden (Abou Samra et al. 1992). Er gehört zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und bindet die N-terminalen 34 Aminosäuren des PTHrP und des PTH. Das Binden des Proteins an den PTH/PTHrP-Rezeptor kann sowohl die Adenylatzyklase (Kovacs et al. 1995) als auch die Phospholipase C und somit die Proteinkinase C (Guo et al. 1995) aktivieren. Auf Grundlage dessen ist die Störung der Kalziumhomöostase im Rahmen der tumor-assoziierten Hyperkalzämie als Wirkung des PTHrP anzusehen. Nachgewiesen werden konnte weiterhin seine Funktion als Wachstums- und

Differenzierungsfaktor bei verschiedenen Tumorzellarten (Burton et al. 1990, Turzynski et al. 1996). Auch Invasivität und Metastasierungsfähigkeit scheinen im Zusammenhang mit PTHrP zu stehen (Untersuchungen an Mammakarzinomen von Southby et al. 1990). Neben den genannten besitzt das Protein zugleich Aufgaben im physiologischen Bereich. Bereits 1989 deutete Martin et al. auf eine mögliche regulative Funktion im fetalen Kalziumhaushalt hin.

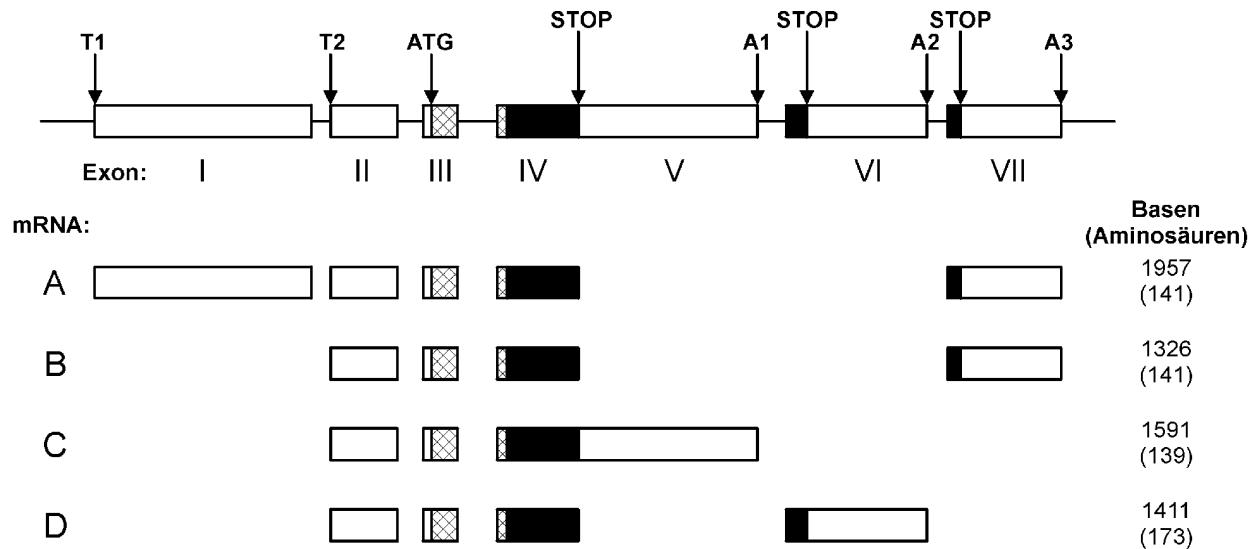


Abb. 1: Alternatives Spleißen der PTHrP-mRNA.

Neben den Exons I bis VII sind die alternativen Transkriptionsstartpunkte (T1, T2), die Stoppssequenzpunkte (STOP) und die Polyadenylierungsstellen (A1, A2, A3) dargestellt. Innerhalb der mRNA werden nichtkodierende Sequenzen (weis), die Führungssequenz (schraffiert) und kodierende Sequenzen (schwarz) unterschieden (nach Nakamura et al. 1995).

Abgesehen von anderen Funktionen des PTHrP weckt vor allem der Zusammenhang zwischen diesem Hormon und der humoral bedingten tumor-assoziierten Hyperkalzämie (HHM) Interesse für die Entwicklung therapeutischer Konzepte. Dabei erweist sich die HHM als ideales Krankheitsbild zur Testung gentherapeutischer ablativer Therapiestrategien. So entspricht die HHM, hervorgerufen durch die Überexpression eines Proteins, dem Bild einer monokausalen Erkrankung. Desweiteren lassen sich Therapieerfolge durch die Messung des Serum-Kalziums einfach und schnell aufzeigen. Als schwerwiegende Erkrankung rechtfertigt die HHM somit neue, experimentelle Therapien.

1.2 Ribozyme im Einsatz gegen Krebszellen

Für die Behandlung maligner Erkrankungen stehen derzeit verschiedene Verfahren zur Verfügung. Die hauptsächlich angewandten Therapieformen sind die operative Entfernung des Tumors, die Strahlen- und die Chemotherapie.

Inhalt neuerer experimenteller Strategien ist es, den Stoffwechsel der Tumorzellen gezielt auf der Ebene der genetischen Informationsübertragung zu beeinflussen. Ein Beispiel hierfür ist die Hemmung der Genexpression durch die Behandlung der Tumorzellen mit geeigneten Substanzen. Zu den Stoffen, die die Translation regulieren können, zählen Antisense-Oligonukleotide (ASO). Diese kurzen DNA-Moleküle hybridisieren an spezifische mRNA-Sequenzen und hemmen so die Expression der entsprechenden Gene (Helene und Toulme 1990).

Auf der gleichen Ebene der genetischen Informationsübertragung wirken bestimmte Oligoribonukleotide. Analog zu den ASO können sie einen Antisense-Effekt hervorrufen. Darüber hinaus besitzen sie jedoch eine katalytische Funktion. Als eine Art Biokatalysatoren unterstützen sie Spaltungsreaktionen an Nukleinsäuren. Zur Bezeichnung dieser Struktur wurde aus den Begriffen *Ribonukleotid* und *Enzym* das Wort *Ribozym* geprägt.

Untersuchungen zu den katalytischen Eigenschaften von Ribonukleinsäuren in den 80er Jahren waren Ausgangspunkt für die Entdeckung der Ribozyme (Cech 1986). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die RNA neben der Rolle als Bote auch andere Aufgaben besitzt. In den folgenden Jahren wurden mehrere Ribozyme entdeckt. Darunter befanden sich das Hairpin-, das Hammerhead-Ribozym sowie das Hepatitis Delta Virus Ribozym (Forster und Symons 1987, Sharmeen 1988, Hampel und Tritz 1989). Heute gilt das Hammerhead-Ribozym als eines der am besten untersuchten Ribozyme. Entscheidende Impulse erhielt diese Entwicklung aus den Arbeiten von Uhlenbeck (1987), Haseloff und Gerlach (1988). Die Bedeutung lag vor allem im Bestimmen einer biologischen Struktur, die gezielt die Spaltung einer variablen Zielsequenz katalysiert.

Bei dem Hammerhead-Ribozym, dessen Name sich von seiner zweidimensionalen Struktur her ableitet, lassen sich aus funktioneller Sicht zwei Bereiche, die Stammschleife und die Flanken, unterscheiden (Abb. 2). Die Stammschleife wiederum teilt sich in konservierte Regionen mit konstanter und in Regionen mit variabler Basensequenz auf (Forster und Symons 1987). Werden Basen in den konservierten Regionen ausgetauscht, so führt dies zu einer verringerten katalytischen Aktivität. Die Flanken bestimmen durch ihre zur Ziel-RNA komplementären Sequenzen die Spezifität des Ribozyms.

Ein entscheidender Bereich der Zielsequenz stellt das NUH-Triplet dar. Für H steht in erster Linie C, jedoch sind auch A und U mögliche Varianten. Für N kann jedes Nukleotid eingesetzt werden (Haseloff und Gerlach 1988, Perriman 1992).

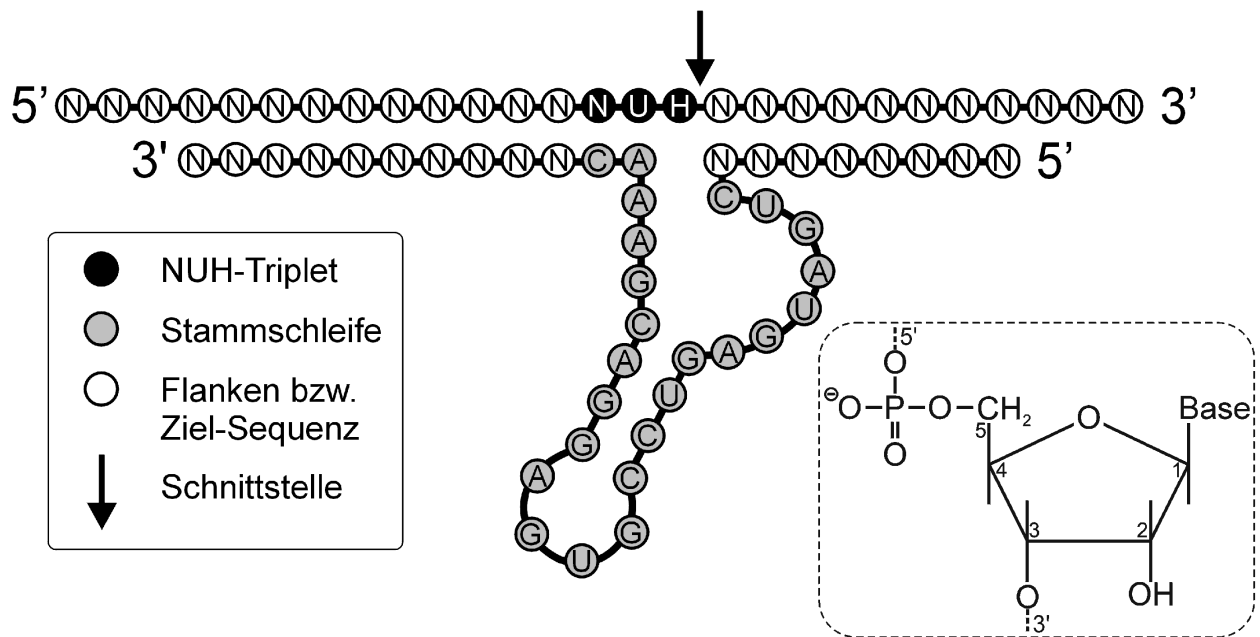


Abb. 2: Hammerhead-Ribozym.

Im Kasten ist ein in den Positionen der Ribose beziffertes Ribonukleotid dargestellt.

Bei der Reaktion wird die Zielsequenz im Anschluss an das NUH-Triplet gespalten. Die hierbei gebildeten RNA-Produkte besitzen 5'-Hydroxylgruppen und 2',3'-zyklische Phosphatgruppen. Wesentlich für die Reaktion ist die Existenz von zweiwertigen Metallionen. Eine reaktionsfördernde Wirkung wurde sowohl für Mg^{2+} -Ionen als auch für Mn^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen nachgewiesen (Uhlenbeck 1987).

Für den Einsatz von Ribozymen zur Hemmung der Genexpression in lebenden Zellen existieren grundsätzlich zwei mögliche Varianten. Zum einen wird durch die Integration des Ribozymgens in das Genom der Wirtszelle die endogene Expression des Ribozyms erlaubt. Zum anderen kann das Ribozym direkt, etwa durch Transfektion mit kationischen Liposomen, in die Zelle eingebracht werden. Da die Handhabung der Ribozyme insbesondere durch ihre hohe Empfindlichkeit gegenüber Nukleasen erschwert wird, besteht der Vorteil der Transfektionsmethode darin, dass Stabilität und Aktivität der Ribozyme vor deren Nutzung durch Modifikationen gesteigert werden können.

In der Literatur wurden bereits verschiedenen Methoden, die der Stabilisierung der Ribozyme dienen, beschrieben. Eine Strategie war es, im Rahmen der chemischen Synthese der Ribozyme spezielle Nukleotide in sie einzufügen. Die in der 2'-Position modifizierten Nukleotide wurden an verschiedenen Positionen und in unterschiedlichem Ausmaß eingebaut. Verwendung fanden 2'-Amino-, 2'-Fluoro-, 2'-Desoxy-, 2'-O-Allyl- und 2'-O-Methyl-ribonukleotide. Diese Modifikationen erhöhten die Stabilität der Ribozyme drastisch, während ihre katalytische Aktivität weitestgehend erhalten blieb (Picken et al. 1991, Paoella et al. 1992, Taylor et al. 1992, Shimayama et al. 1993, Beigelman et

al. 1995). Eine zusätzliche Steigerung der Widerstandsfähigkeit gegenüber Nukleasen nach dem teilweisen Ersatz der Ribonukleotide durch Desoxyribonukleotide konnte durch eingeführte Phosphorthioatverbindungen erreicht werden (Hendry et al. 1992, Shimayama et al. 1993).

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Entwicklung eines metabolisch stabilen Ribozyms. Es sollte ausgehend von einem gegen die PTHrP-mRNA gerichteten Hammerhead-Ribozym derart modifiziert sein, dass es eine hohe katalytische Aktivität und eine ausreichende Resistenz gegenüber Nukleasen aufweist. Bei der Entwicklung und der sich anschließenden Behandlung von Tumorzellen in Monolayer-Zellkultur mit dem Ribozym waren folgende Fragen zu klären:

- Welchen Einfluss haben die verschiedenen Modifikationen des Ribozyms auf seine katalytische Aktivität?
- Welche Bedingungen beeinflussen die Aktivität zusätzlich?
- Lassen sich allgemeine Regeln für die Entwicklung eines metabolisch stabilen Ribozyms aufstellen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Hersteller und Bezugsquellen

Die benutzten Chemikalien wurden in dem Reinheitsgrad pro analysis verwandt.

Agarose, GibcoBRL, Karlsruhe

Ammoniumacetat, Merck, Darmstadt

APS (Ammoniumperoxodisulfat), Merck, Darmstadt

[γ -P³²] ATP, Amersham, Braunschweig

biotinyl. anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Ziege), Dako, Hamburg

biotinyl. anti-Maus-IgG-Antikörper (Kaninchen), Dako, Hamburg

Bis-Tris-Propan, Merck, Darmstadt

Borsäure, Merck, Darmstadt

Bromphenolblau (3',3'',5',5''-Tetrabromophenolsulfonphthalein), Sigma, Deisenhofen

BSA (bovine serum albumin, Fraction V), Serva, Heidelberg

Calciumchlorid-Dihydrat, Merck, Darmstadt

Chloroform, Merck, Darmstadt

Citronensäure, Merck, Darmstadt

Dinatriumhydrogenphosphat, Merck, Darmstadt

EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure Dinatriumsalz), Boehringer, Mannheim

Eisessig, Merck, Darmstadt

Ethanol, J. T. Baker, Deventer, Holland

Ethidiumbromid, Sigma, Deisenhofen

FCS (fetal calf serum), PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich

Formaldehyd, Merck, Darmstadt

Formamid, Merck, Darmstadt

L-Glutamin, Bio Whittaker, Verviers, Belgien

Glycerol, Merck, Darmstadt

Glycogen, Boehringer, Mannheim

Harnstoff, Serva, Heidelberg

Ham's F-10 Medium, Sigma, Deisenhofen

Hep2-Mounting Medium, The binding site, Birmingham, GB

H-Insulin, Hoechst, Frankfurt am Main
Isoamylalkohol, Roth, Karlsruhe
Isopropanol, Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid, Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat, Merck, Darmstadt
Klenow-Enzym, Boehringer, Mannheim
Leibovitz's L-15 Medium, Life Technologies, Eggenstein
Loading-Dye, Promega, Mannheim
Magnesiumchlorid, Fluka-Chemie, Buchs, Schweiz
MEM-Vitamine, Seromed, Berlin
Molecular Weight Marker VIII, Boehringer, Mannheim
monoklonaler anti-PTHrP-IgG-Antikörper (Maus), Dianova, Hamburg
Natriumacetat, Merck, Darmstadt
Natriumazid, Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat, Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid, Merck, Darmstadt
PerFect-Transfection-Kit, Invitrogen, NV Leek, Holland
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1), Sigma, Deisenhofen
Polyacrylamid, Appligene, Heidelberg
Propidiumjodid, Sigma, Deisenhofen
PTHrP (1-86), Bachem, Heidelberg
Salzsäure, Merck, Darmstadt
Schwefelsäure, Merck, Darmstadt
SDS (n-Dodecylhydrogensulfat), Merck, Darmstadt
SA-Pox Konjugat, HRP, Dako, Hamburg
T4-Polynucleotid-Kinase, Promega, Mannheim
T7-RNA-Polymerase, Boehringer, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase, Boehringer, Mannheim
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylen-Diamin), Sigma, Deisenhofen
Transferrin, Boehringer, Mannheim
Trasylol, Bayer, Leverkusen
Tris-Base (Trisaminomethan), Merck, Darmstadt
Trypsin, Seromed, Biochrom, Berlin

Tween 20, Serva, Heidelberg

[α -P³²] UTP, Amersham, Braunschweig

Wasserstoffperoxid 30 %, Merck, Darmstadt

2.1.2 Puffer und Lösungen

2.1.2.1	10x TBE: (für Polyacrylamid[PAA]- Gelelektrophorese)	1 M Tris-Base 0,85 M Borsäure 10 mM EDTA pH 8,0
2.1.2.2	50x TAE: (für Agarosegelelektrophorese)	2,25 M Tris-Base 5,71 % Eisessig 50 mM EDTA pH 8,0
2.1.2.3	Stopppuffer: (für Kinetikversuche)	9 M Harnstoff 100 mM EDTA Loading Dye (1:100)
2.1.2.4	RNA-Elutionspuffer:	0,5 M Ammoniumacetat 0.1 % SDS 1 mM EDTA
2.1.2.5	Trypsinlösung:	0,05 % Trypsin 0,02 % EDTA 1x PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
2.1.2.6	DNA-Auftragspuffer: (für Agarosegelelektrophorese)	10 % Glyzerin 100 µg/ml Ethidiumbromid
2.1.2.7	RNA-Auftragspuffer: (für PAA-Gelelektrophorese)	Formamid 6,25 mM EDTA Loading Dye (1:100)

2.1.2.8	Tris-HCl-Puffer: (für Kinetikversuche)	1 M Tris-Base mit 1 M HCl auf pH 7,5 eingestellt
2.1.2.9	1x PBS pH 7,2:	2,7 mM KCl 136 mM NaCl 1,5 mM KH_2PO_4 8,1 mM Na_2HPO_4

2.1.3 Verbrauchsmaterial

8-Kammer-Objektträger, Nunc, Wiesbaden-Biebrich

96-Loch-Platten, Nunc, Wiesbaden-Biebrich

24-Loch-Platten, Nunc, Wiesbaden-Biebrich

Röntgenfilme, Amersham, Braunschweig

Zellkulturflaschen, Falcon, Becton und Dickinson, Heidelberg

2.1.4 Geräte

Kühlzentrifuge:	Centrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge:	Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg
Wasserbad:	Typ 1003, GFL Gesellschaft für Lebensmittel-Forschung mbH, Berlin
PCR-Cycler:	Trio-Thermoblock, Biometra, Göttingen DNA Thermal Cycler 480, Perkin Elmer, Überlingen
Photometer:	RNA/DNA Calculator Gene Quant II, Pharmacia, Freiburg
Densitometer:	Imaging Densitometer Model GS-670, BioRad, München
Phosphordensitometer:	Molecular Imager Model GS-250, BioRad, München (zugehörig GS-250 Sample Loading Dock, Molecular Imaging Screen-BI, GS-250 Screen Eraser)
Szintillationszähler:	Liquid Scintillation Counter Wallac 1409, Wallac-ADL, Freiburg
Geltrockner:	Gel Dryer Model 583, BioRad, München
UV-Transilluminator:	Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch

Stromversorgungsgeräte:	PP3000, Biometra, Göttingen
(Gelelektrophorese)	ECPS 3000/150, Pharmacia, Freiburg
Mikrotiterplattenwascher:	Model 1250 Immunowash, BioRad, München
Mikrotiterplattenphotometer:	Automated Microplate Reader Model EL340, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, USA
Röntgenkassette:	Hypercassette Neutral (24 x 30 cm) RPN11643, Amersham, Braunschweig
Röntgenfilmentwickler:	Hyperprocessor Automatic Film Processor RPN1700, Amersham, Braunschweig

2.1.5 Software

Für die Verarbeitung des Daten- und Bildmaterials wurde institutseigene Software verwandt. Im Folgenden sind neben den Programmbezeichnungen die Softwarehersteller, der Verwendungszweck und die entsprechenden Dateiformate aufgeführt.

Molecular Analyst, BioRad, München

- densitometrisches Messen radioaktiv markierter Banden im PAA-Gel
 - Erzeugen von Bilddateien der Gele
- Dateiformat: IMG, TIF

Origin, Microcal Software, Inc., Northampton, USA

- graphisches Auswerten der Kinetikversuche
 - Fitten der Graphen
 - Ermitteln der k_{obs} -Werte
 - Statistik, t-Test
- Dateiformat: ORG

Kinetic Calc

- photometrisches Messen der 96-Loch-Platten
 - Ausgabe der Messdaten
- Dateiformat: PRN

Microsoft Powerpoint, Microsoft Corporation

- Zusammenstellen des Bildmaterials
- Beschriften der Bilder

Dateiformat: PPT

Oligo, National Biosciences, Inc., Plymouth, USA

- Erstellen von Primer- und Templatesequenzen

Dateiformat: SEQ

DNASIS, Hitachi Software Engineering Co. Ltd., Yokohama, Japan

- Erstellen von Primer- und Templatesequenzen

Dateiformat: SEQ

EMBL, Datenbank (DKFZ Karlsruhe)

2.1.6 Tumorzellen

Für die Behandlung von Tumorzellen in Monolayer-Zellkultur mit dem stabilisierten Ribozym wurde die Zelllinie RCC 95/96, ein Nierenzellkarzinom, ausgewählt. Diese Zelllinie ist im eigenen Labor etabliert worden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Leibovitz's L-15 und Ham's F-10 Medium.

Zusätze im Leibovitz's L-15 Medium:	10 % FCS, 1 mM L-Glutamin, 1x MEM-Vitamine, 1 µg/ml Transferrin; 0,1 % Glukose, 80 IE/l Insulin, 20.000 kIE/l Trasyol
Zusätze im Ham's F-10 Medium:	1 mM L-Glutamin; 0,9 mM CaCl ₂ (damit insgesamt 1,2 mM enthalten, normocalcämisch)

2.1.7 Ribozyme

Das Hammerhead-Ribozym RbO (Abb. 3) ist eines von drei im eigenen Labor entwickelten Ribozymen. Es katalysiert die Spaltung der PTHrP-mRNA.

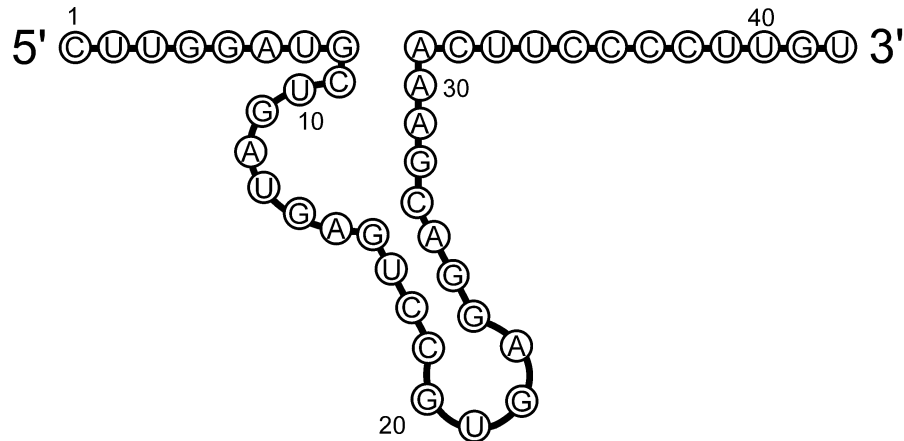


Abb. 3: Hammerhead-Ribozym RbO.

Das Ribozym RbO stellte den Ursprung für die Entwicklung eines metabolisch stabilen Ribozyms dar. Es wurde, wie auch die anderen reinen RNA-Ribozyme (RbM, Rb8/12, Rb5/10 und Rb4/8), durch In-vitro-Transkription hergestellt.

Sämtliche Ribozyme mit DNA-Modifikationen synthetisierte Dr. Sabine Müller vom Institut für Chemie / Fachinstitut für Organische und Bioorganische Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin. Die Synthese erfolgte am Syntheseapparat „Gene Assembler Special“ (Pharmacia, Freiburg).

Um Fehler bei der In-vitro-Transkription des Ribozyms Rb5/10 auszuschließen, wurde dieses zusätzlich am Syntheseapparat synthetisiert.

In der folgenden Tabelle 1 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Ribozyme aufgeführt.

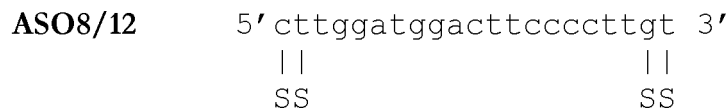
Tabelle 1: Ribozymsequenzen.

Ribozym	Sequenz
RbO	5' CUUGGAUGCUGAUGAGUCCGUGAGGACGAAACUCCCCUUGU 3'
RbM	5' CUUGGAUGC <u>U</u> AUGAGUCCGUGAGGACGAG <u>A</u> CUCCCCUUGU 3'
Rb8/12	5' CUUGGAUGCUGAUGAG--CGUGAG--CGAAACUCCCCUUGU 3'
Rb5/10	5' ---GGAUGCUGAUGAG--CGUGAG--CGAAACUCCCCU-- 3'
Rb4/8	5' ----GAUGCUGAUGAG--CGUGAG--CGAAACUCCCC---- 3'
Rb4/6V1	5' ----gatgCUGAUGAG--CGUGAG--CGAAActtcc----- 3'
Rb5/10V1	5' ---ggatgCUGAUGAG--CGUGAG--CGAAActtccccctt-- 3'
Rb5/10V3	5' ---ggatgctGAtGAg--cgtgag--cGaaActtccccctt-- 3'
Rb5/10V4	5' ---ggatgCUGAUGAg--cgtgag--cGAAActtccccctt-- 3'
Rb5/10V5	5' ---ggaUGCUGAUGAg--cgtgag--cGAAACUccccctt-- 3'
Rb5/10V6	5' ---ggatgCUGAUGAgtcctgtaggacGAAActtccccctt-- 3'
Rb8/12V1	5' cttggatgCUGAUGAG--CGUGAG--CGAAActtcccccttgt 3'
Rb8/12V3a	5' cttggatgctGAtGAg--cgtgag--cGAAActtcccccttgt 3'
Rb8/12V4	5' cttggatgCUGAUGAg--cgtgag--cGAAActtcccccttgt 3'
Rb8/12V5	5' cttggaUGCUGAUGAg--cgtgag--cGAAACUcccccttgt 3'
Rb8/12V6	5' cttggatgCUGAUGAgtcctgtaggacGAAActtcccccttgt 3'
Rb8/12V4PT	5' cttggatgCUGAUGAg--cgtgag--cGAAActtcccccttgt 3' S SSS
RbF (Rb8/12V4PT-F)	5' cttggatgCUGAUGAg--cgtgag--cGAAActtcccccttgt-F 3' S SSS
RbS (Rb8/12V4aPT)	5' cttggatgCUGA <u>A</u> GAg--cgtgag--cGAAActtcccccttgt 3' S SSS SSS
RbSSc (Rb8/12V4aPTSc)	5' tcgtaggtCUGA <u>A</u> GAg--cgtgag--cGAAAttctcgtcctc 3' S SSS SSS

Die in Großbuchstaben dargestellten Basen entsprechen Ribonukleotiden. Austauschmodifikationen mit Desoxyribonukleotiden sind durch kleine Buchstaben angezeigt. Unterstreichungen weisen auf eine veränderte Base gegenüber dem Ribozym RbO hin. Ein Strich (-) kennzeichnet das Fehlen der entsprechenden Base des Ribozyms RbO. Modifizierungen mit Fluorescein und Phosphorothioaten sind durch F bzw. S ausgewiesen.

2.1.8 Antisense-Oligonukleotid

Zusätzlich zu den stabilisierten Ribozymen wurden die Zellen mit einem DNA-Antisense-Oligonukleotid (ASO8/12) behandelt. Mit dessen Hilfe sollte überprüft werden, ob durch die alleinige Bindung des Oligonukleotids an die Zielsequenz der PTHrP-mRNA eine Verminderung der Genexpression des PTHrP bewirkt wird. Das ASO8/12 umfasst 21 Basen und entspricht in seiner Sequenz den Flanken des Ribozyms RbO.



Zwischen die beiden Sequenzen der Ribozymflanken wurde ein Guanin eingeschoben, da sich die Flanken des Ribozyms mit dem Abstand einer Base an die PTHrP-mRNA anlagern. Für die metabolische Stabilität sorgen am 5'- und 3'- Ende je zwei Phosphorothioatmodifizierungen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen als Monolayer erfolgte in 75 cm²-Kulturflaschen in 15 ml Leibovitz's L-15 Medium bei 5 % CO₂, 37 °C und 98 % Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden je nach Konfluenz bis zu zweimal pro Woche passagiert. Hierfür wurde das Medium abgesaugt um die Zellen dann mit 3 ml PBS zu waschen. Nach dem Abziehen des PBS erfolgte die Trypsinierung der Zellen. Dazu wurden diese ca. 10 Minuten mit 3 ml einer trypsinhaltigen Lösung (2.1.2.5) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nachdem sich die Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche abgelöst hatten, wurde die enzymatische Aktivität des Trypsins durch die Zugabe von 3 ml Medium inhibiert. Mittels steriler Pipetten unterschiedlicher Größe fand daraufhin eine Vereinzelung der Zellen in der Zellsuspension statt. Schließlich wurde die Zellsuspension bis auf ein Zehntel abgesaugt. Für die weitere Inkubation der Zellen wurde die Zellkulturflasche mit 15 ml L-15 Medium gefüllt.

2.2.2 Herstellung der Substrat-RNA und der reinen RNA-Ribozyme

Sowohl die Substrat-RNA als auch die reinen RNA-Ribozyme wurden mittels der T7-RNA-Polymerase (Boehringer, Mannheim) durch In-vitro-Transkription hergestellt.

2.2.2.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für eine In-vitro-Transkription mit der T7-RNA-Polymerase sind dsDNA-Templates notwendig, die am 5'-Ende eine T7-Promotorsequenz aufweisen.

Die dsDNA-Templates für die Substrat-RNA und die Ribozyme RbO, RbM und Rb8/12 wurden durch PCR amplifiziert. Die dafür benötigten upstream und downstream Primer lieferte ROTH (Karlsruhe) und TIB-MOLBIOL (Berlin). Im Falle der Ribozyme dienten as-ss-DNA-Templates, die ebenfalls von ROTH hergestellt wurden, als Vorlage für die PCR.

Ausgangsprodukt für das 252 Basenpaare umfassende ds-DNA-Template der Substrat-RNA bildete eine 413 Basenpaare lange Sequenz, die einem Ausschnitt des Exon III und IV der PTHrP-mRNA entspricht. Sowohl Exon III als auch Exon IV sind in allen mRNA-Typen des alternativen Spleißens enthalten (s. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Die verwendete Sequenz war ein PCR-Produkt, das aus RT-PCR-Untersuchungen von A. Bunge (1997) im eigenen Labor hervorging.

Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten PCR-Primer und DNA-Templates

	Sequenz
Primer Up (T7-Promoter)	5 ' attaatagcactcactatag 3 '
Primer Down Substrat-RNA	5 ' ctccgaggttagctctgat 3 '
Primer Down RbO	5 ' acaaggggaagtttcgtc 3 '
Primer Down RbM	5 ' acaaggggaagtctcgtc 3 '
Primer Down Rb8/12	5 ' acaaggggaagtttcgct 3 '
dsDNA-Template	5'ccgggcttgccctttctttttcttcccaggtgtc
Substrat-RNA (413 nt)	ttgagcggctgctctttgtacgtctccaccttggt agtttcctgagttaggtatctgccctcatcatcag acccaaatcggacggggtggttctttgtgttggga

	gagggcttggagttaggggacacctccgaggtagc tctgatttcagctgtgtggatttctgcatcagat ggtgaaggaagaatcgtcgccgtaaattcttgatg gacttccccttgtcatggaggagctgatgttcaga cacagctcttttgaggcggcggctgagaccctcca ccgagcgcccgcaggagggcaccgcgtagctcagc aggaacaccgcgacgctccactgctgaaccagtct ccgctgcatacctatagttagtcgtattaat 3'
dsDNA-Template Substrat-RNA (252 nt)	5'ctccgaggtagctctgatttcagctgtgtggat ttctgcatcagatggtgaaggaagaatcgtcgcc gtaaattcttgatggacttccccttgtcatggagg agctgatgttcagacacagctcttttgaggcggcg gctgagaccctccaccgagcgcccgcaggagggca ccgcgtagctcagcaggaacaccgcgacgctccac tgctgaaccagtctccgctgcatacctatagttagt cgtattaat 3'
as-ssDNA-Template RbO	5' acaaggggaagtttcgctcctcacggactcat cagcatccaagctatagttagtcgtattaat 3'
as-ssDNA-Template RbM	5' acaaggggaagtttcgctcctcacggactcat tagcatccaagctatagttagtcgtattaat 3'
as-ssDNA-Template Rb8/12	5' acaaggggaagtttcgctcacgctcat cagcatccaagctatagttagtcgtattaat 3'

Die PCR wurde in einem Trio-Thermoblock (Biometra, Göttingen) durchgeführt. In Tabelle 3 ist der einfache Reaktionsansatz aufgeführt.

Da alle DNA-Templates am 3'-OH-Ende die 20 Basenpaare lange T7-Promotor-Sequenz besaßen, konnte in allen PCR-Ansätzen der gleiche upstream Primer verwendet werden.

Die PCR-Programme umfassten 30 Zyklen und unterschieden sich lediglich durch die Annealing-Temperatur. Sie betrug für die Substrat-RNA 55 °C und für die Ribozyme 52 °C. In einem ersten Schritt wurde der Ansatz vier Minuten lang bei 94 °C denaturiert. Die folgenden 30 Zyklen enthielten einen 45 Sekunden dauernden Denaturierungsschritt bei 94 °C, einen eine Minute dauernden Schritt mit der Annealing-Temperatur und einen eine Minute langen Extensionsschritt bei 72 °C.

Nach abschließender vierminütiger Extension wurde der Ansatz auf 4 °C gekühlt. Die weitere Lagerung der Reaktionsgefäße erfolgte bei -20 °C.

Tabelle 3: PCR-Reaktionsansatz

Volumen	Reagenz	Endkonzentration
2 µl	dNTP-Mix (je 10 mM)	0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
10 µl	10x Reaktionspuffer	1x (0,1 ml Tris-HCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 50mM KCl, pH 8,3 (20 °C))
1 µl	Taq-DNA-Polymerase	1 U / 100 µl
2 µl	Primer-Mix	1,0 µM downstream und upstream Primer
variabel	Template-DNA	< 1 ng / 100 µl
auf 100 µl	Aqua bidest.	

2.2.2.2 Kontrolle, Reinigung und Fällung des PCR-Ansatzes

Proben aus jedem PCR-Ansatz wurden zur Kontrolle des entstandenen PCR-Produkts zu gleichen Teilen mit einem DNA-Auftragspuffer (2.1.2.6) versetzt und in einem 1,5 %igen bzw. 2,5 %igem Agarosegel aufgetragen. Die Banden des entstandenen PCR-Produkts ließen sich im Gel auf einem UV-Transluminator sichtbar machen.

Zur Vorbereitung der PCR-Produkte auf ihre Verwendung in der In-vitro-Transkription war ein zweimaliges Ausschütteln des Ansatzes mit einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und eines mit einem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) notwendig. Die in der abgezogenen wässrigen Oberphase enthaltene DNA wurde mit einem Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und mit zwei Volumen eiskaltem 100 %igem Ethanol innerhalb von 30 Minuten bei -70 °C gefällt. Im Folgenden wurde die Fällung 15 Minuten lang in einer Kühlzentrifuge bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Nach dem Waschen des entstandenen Pellets mit eiskaltem 70 %igem Ethanol wurde dieses bei Raumtemperatur getrocknet und in RNase-freiem Aqua bidest. aufgenommen.

2.2.2.3 Zweitstrangsynthese

Die Herstellung der dsDNA-Templates der Ribozyme Rb4/8 und Rb5/10 aus ssDNA-Templates und einer Primersequenz erfolgte mit Hilfe des Klenow-Enzyms. Das Enzym katalysiert die Anlagerung von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) an das 3'-OH-Ende einer Primer-/Template-DNA. Die notwendigen ssDNA-Templates und der Primer wurden von ROTH bezogen (Tabelle 4).

Tabelle 4: DNA-Templates und Primer-DNA der Klenow-Enzym-Reaktion.

	Sequenz
as-ssDNA-Template Rb4/8	5' ggggaagtttcgctcacgctcatca gcacacctatagtgagtcgtattaat 3'
as-ssDNA-Template Rb5/10	5' aaggggaagtttcgctcacgctcat cagcatccctatagtgagtcgtattaat 3'
Primer	5' attaatacgactc 3'

Der einfache Reaktionsansatz enthielt ein Volumen von 20 µl (Tabelle 5):

Tabelle 5: Reaktionsansatz zur Zweitstrangsynthese

Volumen	Reagenz	Endkonzentration
2,0 µl	10x Reaktionspuffer	1x (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 0,1 mM Dithioerythritol pH 7,5 (37 °C))
1,0 µl	dNTP	0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
7,5 µl	as-ssDNA-Template	37,5 µM
7,5 µl	Primer	37,5 µM
2,0 µl	Klenow-Enzym	1 U / 5 µl

Er inkubierte über 60 Minuten bei 37 °C im Trio Thermoblock (Biometra, Göttingen). Zur Reinigung wurde der Ansatz nach der Reaktion wie die PCR-Ansätze behandelt (s. 2.2.2.2).

2.2.2.4 In-vitro-Transkription

Die In-vitro-Transkription fand in einem Reaktionsansatz mit einem Volumen von 40 µl statt. Die enthaltenen Reagenzien sind in der Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Reaktionsansatz zur In-vitro-Transkription

Volumen	Reagenz	Endkonzentration
4 µl	10x Reaktionspuffer	1x (40 mM Tris-HCl, 6,0 mM MgCl ₂ , 10 mM Dihiothreitol, 2,0 mM Spermidin, pH 8 [20 °C])
4 µl	NTP-Mix	1,0 mM ATP, CTP, GTP und 0,2 mM UTP
0,5 µl	αP³²-UTP	3.000 Ci/mmol, 10 mCi/ml
1 µl	RNase-Inhibitor	10-50 U / 40 µl
2 µl	T7-RNA-Polymerase	1 U/µl
20 µg	Template-DNA	
auf 40 µl	Aqua bidest.	

Der Ansatz inkubierte drei Stunden lang bei 37 °C. Gestoppt wurde die Reaktion durch die Zugabe von einem Volumen eines RNA-Auftragspuffers (2.1.2.7). Dann erfolgte die Denaturierung der transkribierten RNA durch Erhitzung der Lösung über 90 Sekunden bei 90 °C. Nach dem raschen Abkühlen der Reaktionsgefäße auf Eis wurde der komplette Ansatz in einem 10 %igen denaturierenden Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) aufgetrennt. Durch die Exposition und die Schwärzung eines Röntgenfilms auf dem Gel ließen sich die Banden des Transkriptionsprodukts lokalisieren. Diese wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in 1,5 ml Eppendorfgefäßen mit 375 µl eines RNA-Elutionspuffers (2.1.2.4) versetzt. Die Gefäße inkubierten bei 37 °C über Nacht schüttelnd in einem Thermoblock. Nach viertelstündigem Zentrifugieren mit Maximaldrehzahl in einer Eppendorf-Tischzentrifuge wurde der Überstand abgezogen und mit einem halben Volumen 7 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen eiskaltem 100 %igen Ethanol bei -70 °C innerhalb von 30 Minuten gefällt. Dem Zentrifugieren der Fällung folgte die Messung der Aktivität des mit 70 %igem Ethanol gewaschenen und getrockneten Pellets einem Szintillationszähler. Aus der Aktivität ließ sich die Stoffmenge der gefällten RNA wie folgt errechnen:

$$a = \frac{\text{Aktivität von } \alpha P^{32} \text{ UTP [cpm/}\mu\text{l]} \times \text{Volumen des } \alpha P^{32} \text{ UTP [\mu l]}}{2^c}$$

$$c = \frac{\text{Zeit nach Kalibrierung des } \alpha P^{32} \text{ UTP [d]}}{t_{1/2} [\text{d}]}$$

$$b = \frac{\text{kaltes UTP [nmol]}}{\text{Anzahl von UMP in der Sequenz}}$$

$$n = \frac{b [\text{nmol}] \times \text{Meßwert [cpm]}}{a [\text{cpm}]} = \text{Stoffmenge [nmol]}$$

$$\text{Aktivität von } \alpha P^{32} \text{ UTP} = 10^6 \text{ cpm}/\mu\text{l}$$

cpm = counts per minute

Mit RNase-freiem Aqua bidest. wurde die Konzentration der Ribozyme auf ca. 8 μM und die der Substrat-RNA auf ca. 3 μM eingestellt. Nach dem vollständigen Lösen der Pellets und kurzer Zentrifugation wurde ein definiertes Volumen abgenommen, erneut am Szintillationszähler gemessen und die Konzentrationen der Ribozym Lösungen auf 4 μM und die der Substratlösung auf 1,5 μM verdünnt.

2.2.3 5'-Endmarkierung

Zur radioaktiven Markierung des modifizierten Ribozyms RbS wurde das DNA 5'-End Labeling System (Promega, Mannheim) benutzt. Die darin enthaltene T4 Polynukleotidkinase (PNK) katalysiert die Übertragung der γ -Phosphatgruppe des ATP auf das dephosphorylierte 5'-Hydroxy-Ende eines RNA- oder DNA-Templates.

Die im einfachen Reaktionsansatz enthaltenen Reagenzen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Reaktionsansatz zur 5'-Endmarkierung

Volumen	Reagenz	Endkonzentration
5 μl	10x Reaktionspuffer	1x (70 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , 5,0 mM Dithiothreitol, pH 7,6)
1 μl	$\gamma\text{-P}^{32}$ ATP	4.500 Ci/mmol, 10 mCi/ml

2,5 µl (= 10 pmol)	Ribozym	10 pmol/50 µl = 0,2 µmol
1 µl	T4 PNK	0,2-0,4 U/µl
auf 50 µl	Aqua bidest.	

Der Ansatz inkubierte 20 Minuten lang bei 37 °C. Die folgende Kontrolle der Markierung und Reinigung des markierten Ribozyms über Gelelektrophorese im PAA-Gel erfolgte wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben.

2.2.4 Ribozymkinetik

Für die Stabilisierung des Hammerhead-Ribozyms waren verschiedene Modifikationen geplant. Diese Veränderungen wurden schrittweise durchgeführt, um ihren Einfluss auf die katalytische Aktivität des Ribozyms besser bestimmen zu können.

Die unterschiedlichen Modifikationen des Ribozyms RbO wurden in zellfreien Kinetik-Versuchen miteinander verglichen. In Anlehnung an Arbeiten von Hendry und McCall (1992, 1995a und b) erfolgten diese Versuche unter single-turnover Bedingungen. Hierbei katalysierte das Ribozym, das im eineinhalbfachen Überschuss zum Substrat vorlag, die Spaltung der Substrat-RNA.

2.2.4.1 Versuchsdurchführung

Die Substratspaltung fand in einem Volumen von 24 µl statt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Reaktionsansatz zur Substratspaltung

Volumen	stock-Konzentration	Reagenz	Endkonzentration
8 µl	1,5 µM	Substrat-RNA	0,5 µM
6 µl	4,0 µM	Ribozym	1,0 µM
2 µl	600 mM	Tris-HCl-Puffer	50 mM
8 µl	30 mM	Magnesiumchlorid	10 mM

Der Reaktionsansatz wurde ohne die Zugabe von Magnesiumchlorid zusammenpipettiert, über 90 Sekunden bei 90 °C erhitzt und auf die Reaktionstemperatur von 37 °C abgekühlt. Nach fünfzehnminütiger Vorinkubation bei 37 °C erfolgte die Initialisierung der Reaktion durch die Zugabe des Magnesiumchlorids. Daraufhin wurden zu festgelegten Zeiten Aliquots von 2 µl entnommen und darin die Reaktion mit fünf Volumen Stopppuffer (2.1.2.3) gestoppt. Die Proben lagerten bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C. Schließlich wurden alle Proben in einem 10 %igen denaturierenden PAA-Gel aufgetrennt. Das Gel trocknete nach dem Laufen zwei Stunden lang bei 72 °C auf einem Vakuum-Geltrockner. Die Auswertung der getrockneten Gele erfolgte an einem Phosphordensitometer mit Hilfe der Molecular Analyst Software (BioRad).

2.2.4.2 Modifizierung der Versuchsbedingungen

Für das Ribozym Rb8/12 wurde die Beeinflussbarkeit der katalytischen Aktivität durch den pH-Wert, die Reaktionstemperatur, die Magnesiumkonzentration und durch den Zusatz eines Facilitator-DNA-Oligonukleotids untersucht.

Zunächst wurden in den Reaktionsansätzen einer Versuchsreihe pH-Werte von 6,0, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 und 9,5 durch ein Puffergemisch aus Bis-Tris-Propan und Tris-HCl eingestellt.

In weiteren Versuchen ließ sich durch die Inkubation bei verschiedenen Temperaturen (25°, 37°, 45 °C) die Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von der Reaktionstemperatur analysieren.

Um den Einfluss der Magnesiumkonzentration auf die Reaktion zu ermitteln, wurden die Konzentration in vier Versuchen auf Werte von 2, 10, 50 und 200 mM angepasst.

Eine Facilitator-DNA ist ein ssDNA-Oligonukleotid, dessen Sequenz es ihm ermöglicht, sich direkt benachbart zum 3'-OH-Ende des Ribozyms an die Substrat-RNA anzulagern. Dies bewirkt eine Stabilisierung des Ribozym-Substrat-RNA-Komplexes (Nesbitt und Goodchild, 1994). Die Sequenz für die verwendete Facilitator-DNA lautet: 5'catggaggagct 3'.

Im Reaktionsansatz lag die Facilitator-DNA in einer Konzentration von 1 µM vor.

Des Weiteren wurde für das stabilisierte Ribozym RbS die Beeinflussung der Aktivität durch ein kationisches Lipid getestet. Das Lipid 6 aus dem PerFect Transfection Kit (Invitrogen) war in einem Reaktionsansatz in einer Konzentration von 170 µg/ml enthalten.

2.2.4.3 Versuchsauswertung

Zur Auswertung der Versuche wurden die getrockneten, radioaktiven Gele in den Belichtungskassetten des Phosphordensitometers fixiert. Darin exponierten sie Bildplatten. Die Expositionszeit

richtete sich nach der Stärke der radioaktiven Markierung. Sie lag zwischen einer Stunde und drei Tagen. Das Lesen der Bildplatten erfolgte am Phosphordensitometer. Dabei wurde durch die Molecular Analyst Software eine Lesedatei (IMG) erstellt. Mit deren Hilfe konnten die densitometrischen Werte für Substrat-, Produkt- und Ribozymbanden quantifiziert und bildhaft dargestellt werden. Für die Übergabe der Bilddaten an die Microsoft Powerpoint Software war eine Konvertierung des Dateiformat notwendig (TIF). Der densitometrische Wert für die 3'-Produktbande musste rechnerisch ermittelt werden, da sich diese Bande im Vergleich zu den anderen schwieriger vom Hintergrund abgrenzen ließ. Die durch die Quantifizierung erhaltenen Werte wurden zur Bestimmung der prozentualen Produktentstehung genutzt.

Für jeden Zeitwert (ein Zeitwert entspricht im Gel einer Bahn) wurde die prozentuale Produktentstehung errechnet. Sie ergibt sich aus dem Verhältnis zwischen dem bis dahin entstanden Produkt (Summe der Produktbanden) und dem insgesamt eingesetzten Substrat (Summe aus beiden Produktbanden und verbleibender Substratbande). In einem Koordinatensystem gegenüber der Reaktionszeit aufgetragen, ergab sich für die Produktentstehung eine Wachstumskurve. Diese ließ sich mit Hilfe der Software Origin anpassen. Grundlage für die Kurvenanpassung bildete die folgende exponentielle Funktion (Hendry et al. 1992):

$$\mathbf{P_t} = \mathbf{P_\infty} - \mathbf{P_\Delta}^{-\mathbf{k_{obs} \cdot t}}$$

Die Variable $\mathbf{P_t}$ entspricht dem prozentualen Anteil des entstandenen Produkts zum Zeitpunkt \mathbf{t} . $\mathbf{P_\infty}$ gleicht der maximalen Produktentstehung im Unendlichen. $\mathbf{P_\Delta}$ ist die Differenz aus der maximalen Produktentstehung und der Produktbildung zum Zeitpunkt Null. Alle drei Werte sind prozentuale Anteile in Bezug auf das gesamte Substrat. Die Reaktionszeit wird mit \mathbf{t} dargestellt.

Der $\mathbf{k_{obs}}$ -Wert [min^{-1}] ist eine Konstante erster Ordnung für diese Reaktion. Er beschreibt die initiale und somit maximale Spaltungsrate in dieser Reaktion. In dieser Arbeit bildete er die Grundlage für die Einschätzung der Aktivität der Ribozyme.

Im Anschluss an die Auswertung der Versuche am Phosphordensitometer wurden zur direkten, nicht digitalen Dokumentation mit Hilfe der getrockneten Gele in Röntgenkassetten Röntgenfilme geschwärzt.

2.2.4.4 Vergleich der DNA-modifizierten Ribozyme

Für einen Vergleich der Ribozyme mit DNA-Modifizierungen wurden Änderungen in der Versuchsdurchführung und -auswertung vorgenommen. Die Reaktionsansätze besaßen ein Volumen von 15 µl. In diesen waren das Ribozym in einer Konzentration von 500 nM und das Substrat von 300 nM enthalten. Die Entnahme von Aliquots erfolgte jeweils nach 10 und 120 Minuten. Abgesehen von diesen Änderungen folgte die Versuchsdurchführung den oben genannten Schritten. Bei der Auswertung der densitometrisch ermittelten Werte für die Produktentstehung wurde eine vereinfachte Form der exponentiellen Wachstumsfunktion benutzt.

Die Funktion

$$P_t = P_\infty - P_\infty^{-k \cdot t}$$

verläuft durch den Ursprung des Koordinatensystems. Sie geht damit von der Annahme aus, dass zum Zeitpunkt P_0 ($t = 0$) keine Produktbildung vorliegt. Der so ermittelte Wert k weicht von dem k_{obs} -Wert ab, genügt jedoch für einen Vergleich der Ribozyme. Zudem lässt sich die maximale Produktbildung P_∞ bestimmen.

2.2.5 Stabilitätstest

Um die metabolische Stabilität gegenüber Exo- und Endonukleasen zu untersuchen, wurden das unmodifizierte Ribozym RbO und das Ribozym RbS 1 %igem Kälberserum (FCS) ausgesetzt.

Die Konzentration der Ribozyme in den Versuchsansätzen betrug 1 µM. Im Gesamtvolumen von 20 µl wurden 2 %ige FCS- und 2 µM Ribozymstammlösung zu gleichen Teilen gemischt und bei 37 °C inkubiert. Während des Versuchs wurden zu definierten Zeiten Proben a 2 µl entnommen. Diese wurden mit 5 Volumen Stopppuffer (2.1.2.3) versetzt und lagerten zunächst bei -20 °C, um den weiteren Abbau der Ribozyme zu stoppen. Die Proben wurden in einem 20%igen denaturierenden PAA-Gel aufgetrennt. Nach der Exposition eines Röntgenfilms auf dem Gel erfolgte dessen Auswertung an einem Densitometer. Dabei wurde der Ribozymabbau mit Hilfe der Molecular Analyst Software (BioRad) quantifiziert und die Halbwertszeit der Ribozyme berechnet.

2.2.6 Transfektion

Für die Wirkung des stabilisierten Ribozyms *in vivo* ist dessen erfolgreiche Transfizierung in die Zellen notwendig. Die Transfektion sollte mit Hilfe eines kationischen Lipids erfolgen. Es wurden in Transfektionsversuchen acht verschiedene Lipide des PerFect Transfection Kit (Invitrogen) zusammen mit dem Ribozym RbF getestet.

Das Ribozym RbF ist am 3'-OH-Ende mit Fluorescein markiert. Nach Anregung mit kurzwelligem Licht (490 nm) emittierte Fluorescein Licht einer Wellenlänge von 515 nm und ist somit unter dem Mikroskop sichtbar.

In Vorbereitung der Transfektion wurden die Zellen der Zelllinie RCC 95/96 nach der Passage in den Kulturflaschen in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer gezählt. Dann erfolgte die Aussaat der Zellen in 8-Kammer-Objektträger. In jede Kammer wurden ca. 20.000 Zellen in 300 µl Leibovitz's L-15 Medium gegeben. Nach Inkubation der Zellen über Nacht waren die Objektträger subkonfluent bewachsen. Um die Zellen unter serumfreien Bedingungen zu transfizieren, wurden die Kammern dreimal mit 300 µl serumfreiem Ham's F-10 gewaschen. Danach inkubierten die Zellen mit 300 µl modifizierten Ham's F-10.

Die Herstellung des modifizierten Ham's F10 erfolgte eine halbe Stunde vor Beginn der Transfektion. Zunächst wurden Lipid und Ribozym getrennt in je 150 µl Ham's F-10 aufgenommen. Die Lipidkonzentration im Medium betrug 24 µg/ml. Das Ribozym wurde im Massenverhältnis 1 : 6 zum Lipid im Medium gelöst und lag somit in einer Konzentration von 4 µg/ml vor. Nach viertelstündiger Inkubation der beiden Teillösungen bei Raumtemperatur wurden diese vereinigt und inkubierten eine weitere Viertelstunde. Das Ribozym besaß nun in diesem Medium eine Konzentration von 166 nM. Vor der Behandlung der Zellen mit dem modifizierten Medium wurde es auf 37 °C erwärmt.

Die Transfektionszeit betrug 60 Minuten. Danach wurden die Objektträger fünf Minuten lang in 1x PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch 10minütige Inkubation der Objektträger in einer Lösung aus 3,7 % Formaldehyd in 1x PBS. Um die Zellen unter dem Mikroskop besser lokalisieren zu können, wurden die Zellkerne mit 100 µl verdünnter Propidiumjodidlösung gefärbt (10 µl 95 %ige Propidiumjodidlösung in 10 ml 1x PBS). Anschließend waren die Objektträger wiederholt in 1x PBS zu waschen. Dann konnten die Kammerwände entfernt werden. Schließlich wurden die Objektträger mit Hilfe von Hep2-Mounting Medium und einem Deckgläschen eingedeckelt. Die Begutachtung der Zellen erfolgte an einem konfokalen Mikroskop.

2.2.7 Behandlung der Zellen

Die Zellen des Nierenzellkarzinoms RCC 95/96 wurden in Zellkultur mit den stabilisierten Ribozymen RbS, RbSSc und dem Antisense-Oligonukleotid (ASO8/12) behandelt. Für diese Behandlung war folgende Vorbereitung der Zellen notwendig: Nach der Passage in der Kulturflasche wurden die Zellen in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer gezählt und in 24-Loch-Platten (Nunc) ausgesät. Die Aussaat von 200.000 Zellen in 2 ml Leibovitz's L-15 Medium je Loch erwies sich dabei als optimal, da so nach der Inkubation über Nacht bei 37 °C eine konfluente Bewachsung vorlag. Am nächsten Tag wurde das L-15 Medium abgesaugt und jedes Loch dreimal mit 2 ml Ham's F-10 gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation der Zellen bei 37 °C mit 250 µl modifizierten Ham's F-10. Dabei wurden die Zellen in jeweils drei Löchern gleich behandelt. Die Herstellung des mit den Ribozymen modifizierten Ham's F-10 ist im Abschnitt 2.2.6 beschrieben.

Das Antisense-Oligonukleotid ist für die Behandlung der Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen (1 bis 10 µM) im Ham's F-10 verdünnt worden. Das mit dem ASO8/12 modifizierte Medium enthielt kein kationisches Lipid.

Nach 60minütiger Inkubation wurden aus jedem Loch zwei Proben von 100 µl des Behandlungsmediums entnommen und in eine vorbehandelte (s. 2.2.8) 96-Loch-Platte (Nunc) aufgetragen. Um ein Antrocknen der Zellen zu verhindern, erfolgte sofort das Auffüllen der Löcher mit 2 ml unmodifiziertem Ham's F10. Nach dem Absaugen der Löcher fand eine erneute Inkubation der Zellen mit 250 µl unmodifiziertem Ham's F-10 statt. Wiederum nach 60 Minuten wurden zwei 100 µl-Proben je Loch entnommen und in die 96-Loch-Platte pipettiert.

Insgesamt ergaben sich für beide Entnahmezeiten und für jede unterschiedliche Behandlung jeweils sechs Proben aus den Zellüberständen. Die in den sechs Proben durch ELISA ermittelten Werte für die PTHrP-Sekretion wurden in der Auswertung gemittelt. Somit resultierten für jede Behandlung zwei Werte. Der erste Wert entsprach der PTHrP-Menge, die während der 60minütigen Behandlung durch die Zellen sezerniert wurde und der zweite Wert der Menge an PTHrP, die in den 60 Minuten nach der Behandlung sezerniert wurde.

.

2.2.8 Enzyme-linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)

Der Prüfstein für die Wirksamkeit des stabilisierten Ribozyms bei der Behandlung von Zellen in Zellkultur war die Sekretion des PTHrP in das Kultivierungsmedium. Diese sollte sich durch erfolgreiche Spaltung der PTHrP-mRNA mittels Ribozym messbar vermindern. Für den quantitativen Nachweis des PTHrP in den Zellkulturüberständen wurde ein one-site-ELISA genutzt.

2.2.8.1 Prinzip des one-site-ELISA

Beim one-site-ELISA wird ein über unspezifische Bindungen an eine Mikrotiterplatte gebundenes Antigen durch einen monoklonalen Primärantikörper detektiert. An diesen wird ein biotinylierter Sekundärantikörper gekoppelt. Die Biotin-Streptavidin-Bindung koppelt den zweiten Antikörper mit einem Streptavidin-Peroxydase-Konjugat. Eine Erhöhung der Sensitivität des ELISA lässt sich durch das Einfügen eines weiteren biotinylierten Antikörpers (Tertiärantikörper) erzielen (Abb. 4).

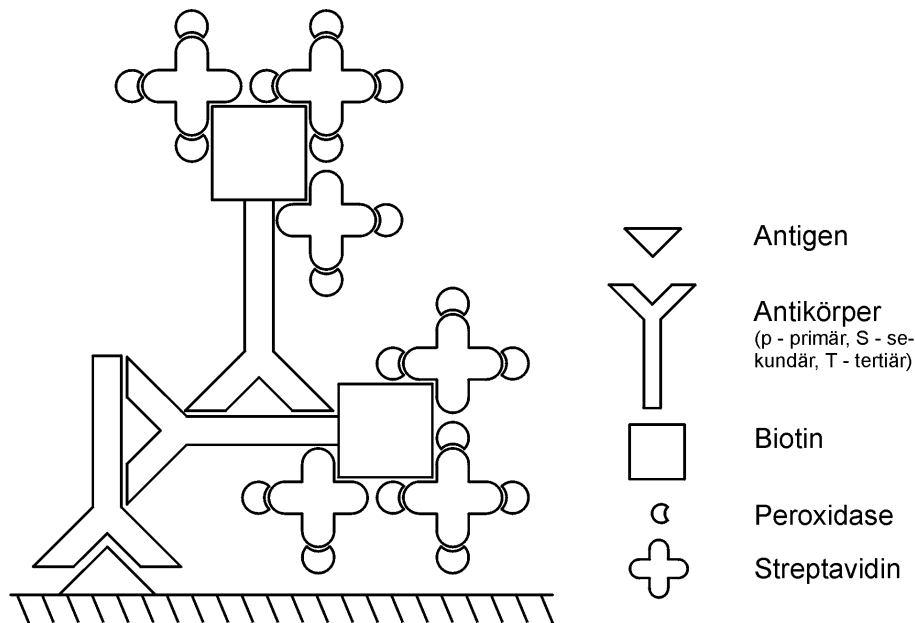


Abb. 4: Prinzip des one-site-ELISA.

2.2.8.2 Durchführung des one-site-ELISA

In Vorbereitung des one-site-ELISA wurden verschiedene Lösungen hergestellt.

Carbonatpufferlösung pH 10,5:	Natriumcarbonat 0,25 M Natriumazid 0,5 %
Blocklösung:	2 % BSA in 1x PBS
Waschlösung:	1 Liter 1x PBS mit 0,5 ml Tween 20
Verdünnungslösung für	
Antikörper und SA-POX:	Waschlösung mit 1 % BSA
1. Antikörperlösung:	monoklonaler Primärantikörper (Maus) 1:2000 verdünnt
2. Antikörperlösung:	biotinyl. anti-Maus-IgG (Kaninchen) 1:2000 verdünnt
3. Antikörperlösung:	biotinyl. anti-Kaninchen-IgG (Ziege) 1:2000 verdünnt
SA-POX-Lösung:	Streptavidin-Peroxidase-Konjugat 1:5000 verdünnt
Citrat-Phosphatpufferlösung pH 5,0:	Citronensäure 0,15 M Dinatriumhydrogenphosphat 0,15 M
Substratlösung:	10, 5 ml Citrat-Phosphatpufferlösung 105 µl TMB 10mg/ml 3,5 µl Wasserstoffperoxid 30 %

Bevor die Zellüberstände in die 96-Loch-Platte (ELISA-Platte) gegeben wurden, erfolgte eine Vorbehandlung der Löcher mit 20 µl Carbonatpuffer. Das so entstandene alkalische Milieu ermöglichte dem Peptid PTHrP eine bessere Bindung an die Gefäßwand.

Zusätzlich zu den Zellüberständen wurde auf jeder ELISA-Platte eine Eichreihe aufgetragen. Das PTHrP 1-86 (BACHEM, Heidelberg) nahm darin Konzentrationen von 5 nM bis 50 pM an. Die mit den Zellüberständen und der Eichreihe beschickten Platten inkubierten über Nacht bei 4 °C.

Am folgenden Tag wurden die Platten abgesaugt und auf saugfähigen und fusselfreien Papiertüchern ausgeklopft. In jedes Loch wurden 200 µl der Blocklösung gegeben. Um die Immunreaktion zu beschleunigen, wurden alle Lösungen auf 37 °C vorgewärmt. Mit der Blocklösung inkubierten die Platten schwimmend in einem Wasserbad bei 37 °C. Zwischen allen Inkubationsschritten, die eben-

falls bei 37 °C stattfanden, war ein dreimaliges Waschen der ELISA-Platten mit der Waschlösung notwendig. Diese Waschschr tte erfolgten mit Hilfe eines Mikrotiterplattenwaschers. Um Reste der Waschlösung zu entfernen, wurden die Platten nach dem Waschen auf Papier ausgeklopft.

Nach der 45min tigen Inkubation der Platten mit der Blocklösung und dem anschließenden Waschen fand eine Beladung der Löcher mit der ersten Antikörperlösung statt. Es wurden pro Loch 100 µl Lösung pipettiert. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden. Die sich anschließenden Inkubationen mit je 100 µl der zweiten und dritten Antikörperlösung sowie der SA-POX-Lösung dauerten jeweils eine Stunde. Nach dem dreimaligen Waschen wurden die Platten mit Citrat-Phosphatpuffer behandelt. Ein weiterer Waschschr tt folgte nicht. Die Citrat-Phosphat-pufferlösung wurde durch Ausklopfen entfernt und die einzelnen Löcher mit 100 µl Substratlösung beschickt.

Die entstehende Farbreaktion ließ sich durch Zugabe von 1 %iger Schwefelsäure stoppen. Es folgte die Messung der Extinktion der ELISA-Platten am Mikrotiterplattenphotometer. Mit Hilfe der Kinetic Calc Software wurden die Messwerte ausgewertet.

2.2.9 Statistik

Die Mittelwerte und die Standardabweichungen für die k_{obs} -Werte der Ribozyme RbO und RbS wurden aus mindestens drei Versuchen errechnet. Aussagen über die signifikante Verschiedenheit der Werte konnten mittels Student's t-Test für unabhängige Stichproben getroffen werden.

Die Extinktionswerte, die nach der Behandlung der Zellen in den Überständen gemessenen wurden, sind für mindestens vier gleiche Behandlungen nach Abzug eines Leerwertes gemittelt worden. Mit dem Student's t-Test für unabhängige Stichproben wurde analysiert, ob die Ergebnisse zur Kontrollbehandlung signifikant verschieden sind.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung der RNA-Ribozyme und der Substrat-RNA

Für die In-vitro-Transkription mit der T7-RNA-Polymerase sind dsDNA-Templates notwendig. Sie wurden für die Substrat-RNA und die Ribozyme RbO, RbM und Rb8/12 durch PCR amplifiziert. Die Kontrolle der PCR-Produkte erfolgte durch Elektrophorese im Agarosegel (Abb. 5 und Abb. 6). Die dsDNA-Templates der Ribozyme Rb5/10 und Rb4/8 wurden mit dem Klenow-Enzym hergestellt.

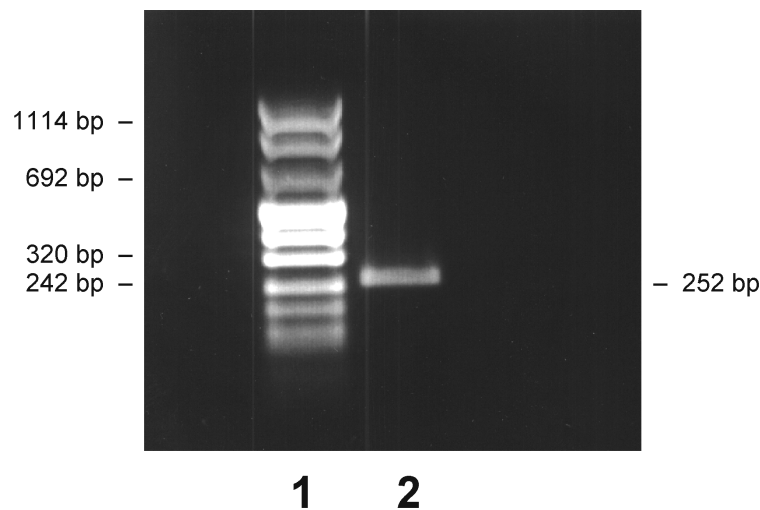


Abb. 5: DNA-Template für Substrat-RNA.

1,5 %iges Agarosegel, 1: DNA-Längenmarker VIII, 2: DNA-Template für Substrat-RNA (252 bp).

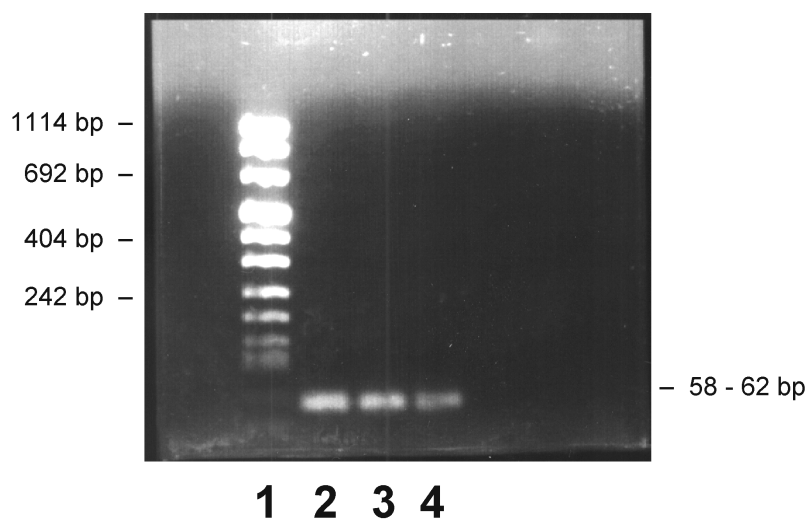


Abb. 6: DNA-Templates für Ribozyme.

2 %iges Agarosegel, 1: DNA-Längenmarker VIII, 2 - 4: DNA-Templates der Ribozyme RbO (2), RbM (3) (beide 62 bp) und Rb8/12 (4) (58 bp).

Nach der In-vitro-Transkription wurde der gesamte Reaktionsansatz im Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) aufgetrennt (Abb. 7). Die Transkripte ließen sich durch Ausschneiden und Elution aus dem Gel reinigen. Das radioaktive Signal der gereinigten RNA wurde in einem Szintillationszähler gemessen. Aus den Messwerten konnte die Ausbeute an gereinigter RNA pro Transkriptionsansatz errechnet werden. Sie lag abhängig vom dsDNA-Template zwischen 20 und 200 pmol.

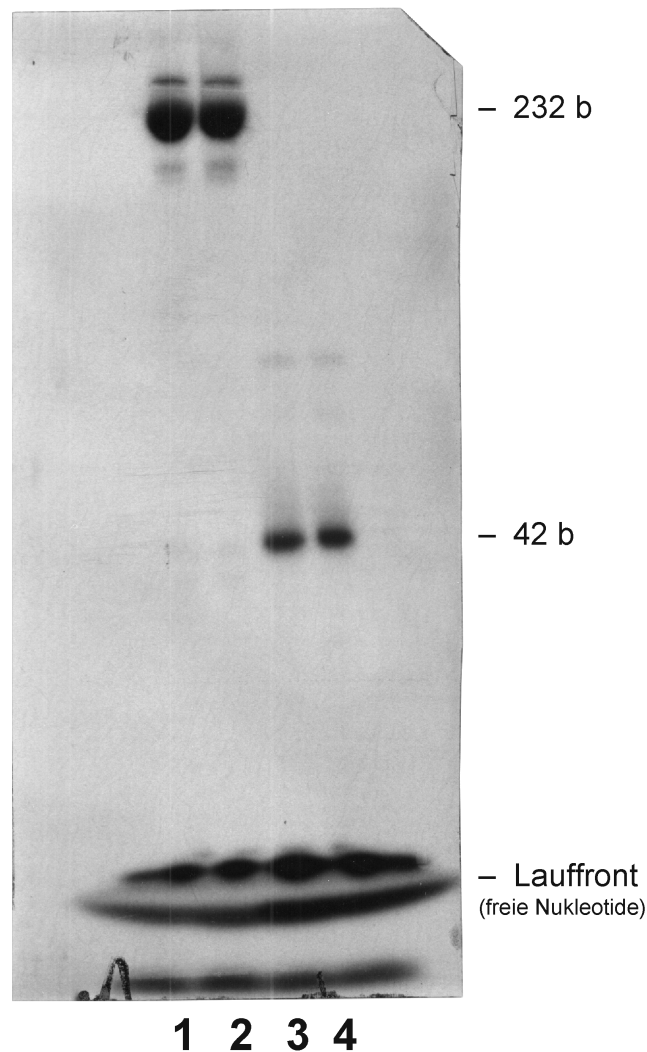


Abb. 7: In-vitro-Transkription.

10 %iges denaturierendes (7 M Harnstoff) PAA-Gel, 1 und 2: Substrat-RNA (232 b), 3 und 4: Ribozym RbO (42 b).

3.2 Ribozymkinetik

Die bei den kinetischen Untersuchungen erhobenen Daten basieren auf der densitometrischen Auswertung von Bildplatten an einem Phosphordensitometer. Auf den Bildern, die dabei mit Hilfe der Molecular Analyst Software erstellt wurden, sind die Banden der ungespaltenen Substrat-RNA

(232 b), die Banden der Spaltprodukte (152 und 80 b) und die Banden der radioaktiv markierten Ribozyme (zwischen 42 und 30 b) zu sehen.

3.2.1 Katalytische und nicht katalytische Variante des Hammerhead-Ribozyms

Zunächst erfolgte ein Vergleich des unmodifizierten Hammerhead-Ribozyms RbO mit seinem nichtkatalytischen Pendant RbM. Sie unterscheiden sich zueinander durch den Wechsel zweier Basen in der Stammschleife. Es wurde das Guanin an Position 11 gegen ein Adenin und das Adenin an Position 30 gegen ein Guanin ausgetauscht.

Für das Ribozym RbO wurde die Bestimmung des k_{obs} -Wert dreimal durchgeführt. Der daraus errechnete Mittelwert betrug $47,42 \text{ min}^{-1} (\times 10^{-3})$. Die mittlere Standardabweichung lag bei $8,86 \text{ min}^{-1} (\times 10^{-3})$. Das Ribozym RbM zeigte erwartungsgemäß keine katalytische Aktivität (Abb. 8 und Abb. 9).

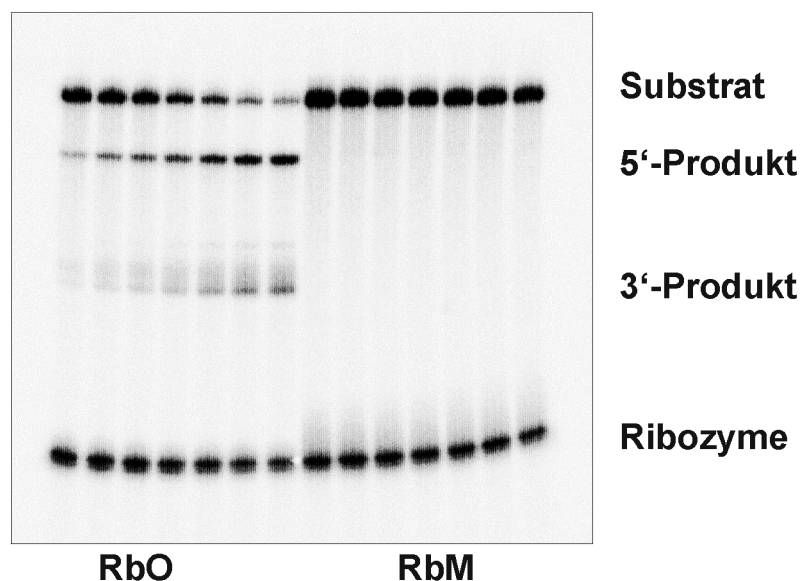


Abb. 8: Spaltung der Substrat-RNA durch die Ribozyme RbO und RbM.

Es ist das bei der Auswertung am Phosphordensitometer erzeugte Bild eines getrockneten 10 %igen denaturierenden PAA-Gels dargestellt. Es zeigt die Substratspaltung für die Ribozyme RbO und RbM nach 0,5, 1,5, 3, 10, 30, 90 und 150 Minuten.

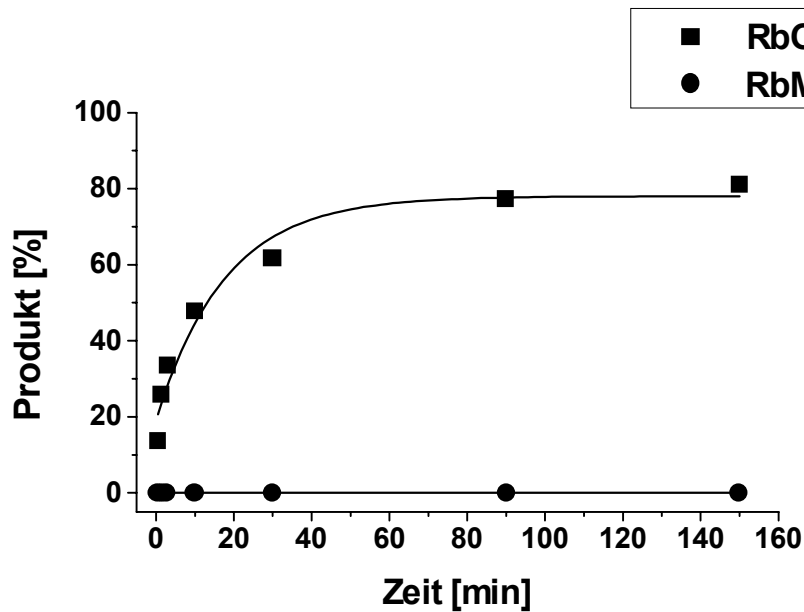


Abb. 9: Vergleich der Ribozyme RbO und RbM.

Die dargestellten Kurven entsprechen der zeitabhängigen Produktentstehung während der Reaktion.

3.2.2 Verkürzung der Stammschleife und der Flankenlängen

Als erste Modifizierungen des Hammerhead-Ribozyms RbO wurden Verkürzungen der Stammschleife und der Flanken vorgenommen. Dazu wurden die Ribozyme Rb8/12, Rb5/10 und Rb4/8 erstellt.

Durch Baseneinsparung in den Positionen 17, 18, 25 und 26 besitzt das Ribozym Rb8/12 eine kürzere Stammschleife als das Originalribozym (RbO). Die Ribozyme Rb5/10 und Rb4/8 zeichnen sich sowohl durch eine kürzere Stammschleife als auch durch kleinere Flanken (Verkürzung von 8 und 12 Basen auf 5 und 10 sowie 4 und 8 Basen) aus.

Im Vergleich der Ribozyme zeigte das Ribozym Rb8/12 eine zweimal höhere Aktivität als das Ribozym RbO. Die Ribozyme mit verkürzten Flanken wiesen hingegen eine um 25 % (Rb4/8) bis 50 % (Rb5/10) verminderte Aktivität gegenüber RbO auf (Abb. 10 und Abb. 11).

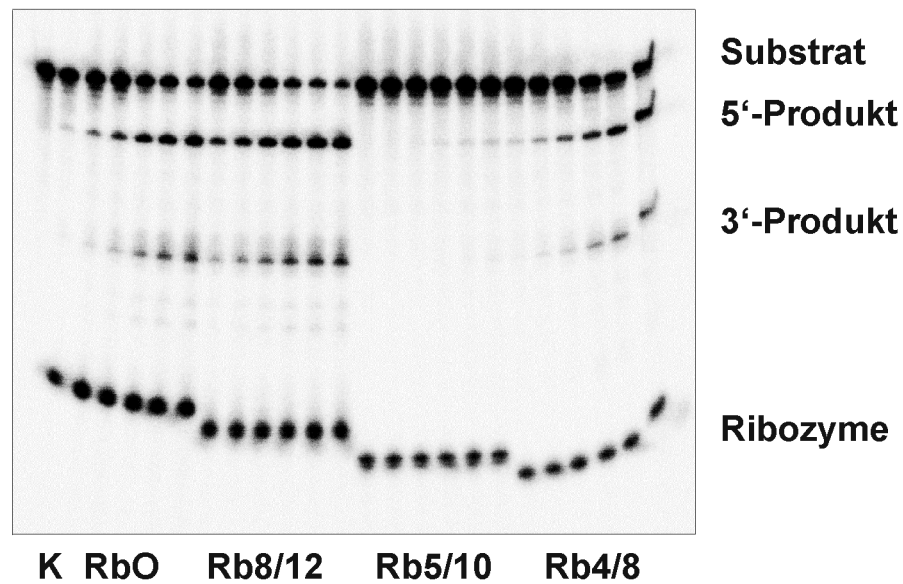


Abb. 10: Vergleich der Ribozyme RbO, Rb8/12, Rb5/10 und Rb4/8.

In der ersten Bahn wurde ein Kontrollwert (K) aufgetragen. Er entspricht einer Probe nach 120 Minuten aus einem ribozymfreien Reaktionsansatz. In den übrigen Bahnen ist die Substratspaltung der Ribozyme nach 2,5, 5, 10, 30, 60 und 120 Minuten dargestellt.

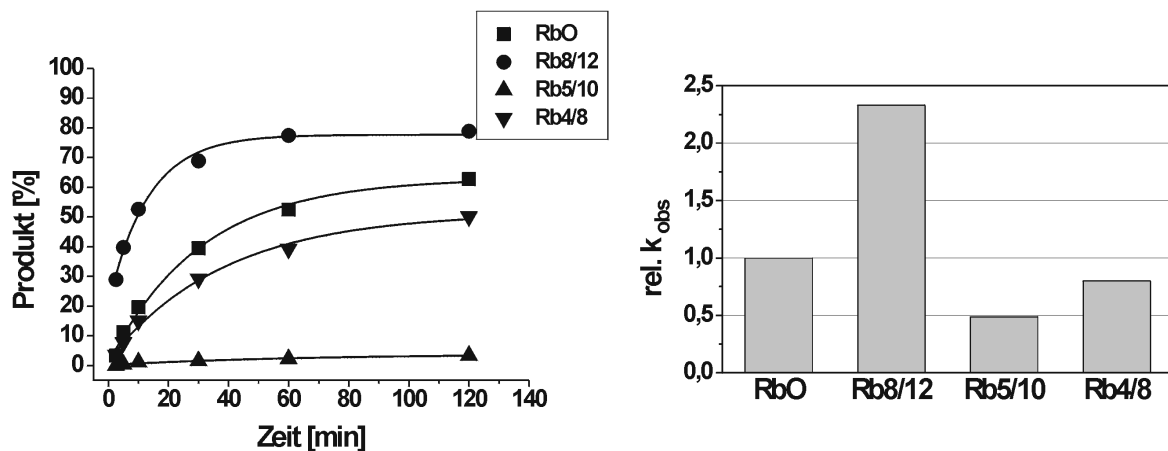


Abb. 11: Auswertung des Vergleichs der Ribozyme RbO, Rb8/12, Rb5/10 und Rb4/8.

Die ermittelten k_{obs} -Werte sind im Säulendiagramm im Verhältnis zum k_{obs} -Wert des Ribozyms RbO (entspricht 1,0) dargestellt.

3.2.3 Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die katalytische Aktivität des Ribozyms Rb8/12

Um einschätzen zu können, wie sich veränderte Reaktionsbedingungen auf die katalytische Aktivität eines Hammerhead-Ribozyms auswirken, sind der pH-Wert, die Reaktionstemperatur und die Ma-

gnesiumkonzentration bei Spaltversuchen des Ribozyms Rb8/12 variiert worden. Zudem wurde der Einfluss einer Facilitator-DNA auf die Reaktion getestet.

Die bei der Auswertung ermittelten k_{obs} -Werte wurden mit den unter Standardbedingungen errechneten verglichen. Zur besseren Veranschaulichung sind die letzteren als 1,0 angenommen worden. Als Standardbedingungen galten ein pH-Wert von 7,5, eine Reaktionstemperatur von 37 °C und eine Magnesiumkonzentration von 10 mM. Der k_{obs} -Wert für die Reaktion ohne Zugabe eines Facilitators wurde auf 1,0 gesetzt.

In den Versuchen zur pH-Abhängigkeit stellte sich für das Ribozym Rb8/12 ein pH-Optimum von 9,5 heraus. Bei pH-Werten unterhalb von 6,0 verlor das Ribozym seine Aktivität.

Die Reaktionen bei 25, 37 und 45 °C zeigten, dass eine Erhöhung der Reaktionstemperatur in diesem Bereich mit einer Steigerung der Aktivität des Ribozyms einhergeht.

Eine ebenso positive Abhängigkeit wies die Aktivität des Ribozyms in einem Bereich zwischen 2 und 200 mM von der Magnesiumkonzentration auf.

Durch die Zugabe eines Facilitators stieg die katalytische Aktivität um 60 % (Abb. 12).

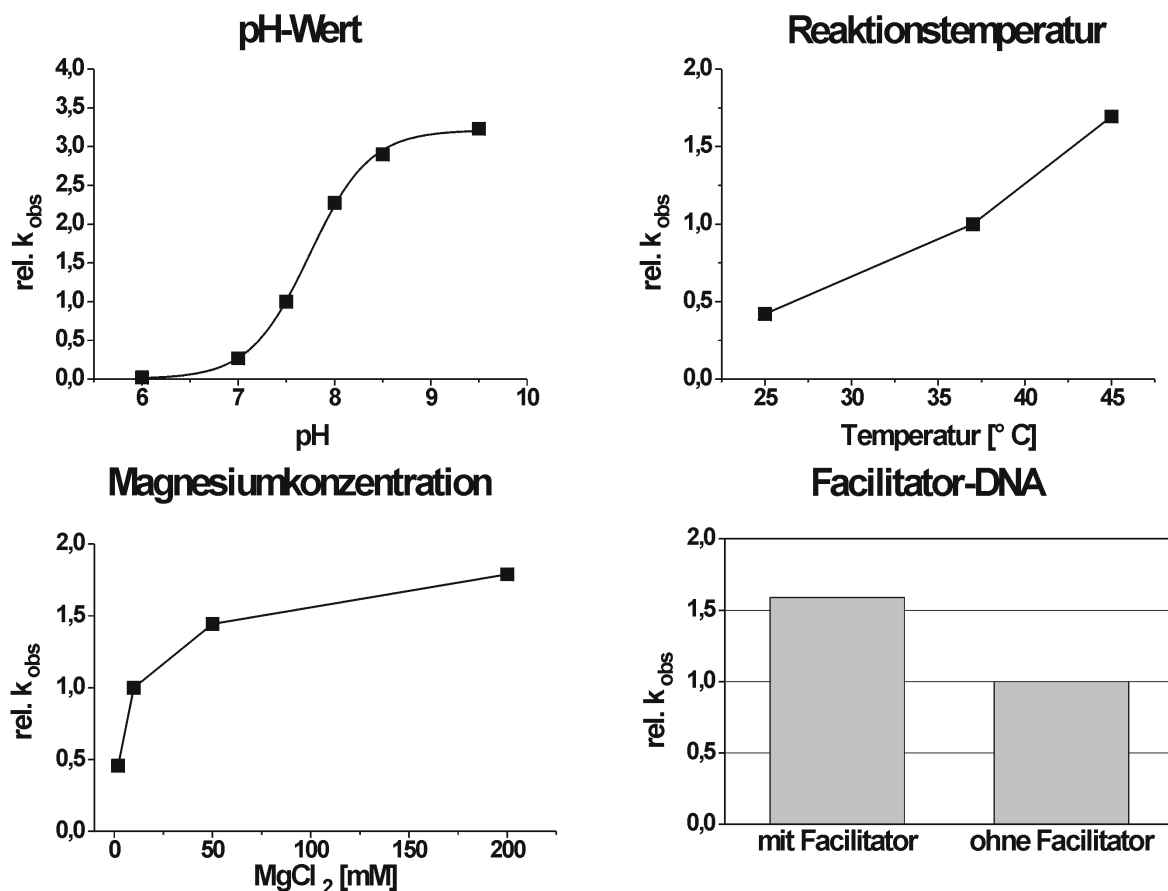


Abb. 12: Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die Aktivität des Ribozyms Rb8/12.

Die k_{obs} -Werte sind im Verhältnis zu den unter Standardbedingungen (pH 7,5, 37 °C, 10 mM Magnesium, ohne Facilitatorzugabe) ermittelten k_{obs} -Werten dargestellt.

3.2.4 RNA-DNA-Ribozyme

Der nächste Schritt bei der Entwicklung eines metabolisch stabilen Ribozyms bestand im teilweisen Austausch von Ribonukleotiden durch Desoxyribonukleotide. Ausgangsprodukt für diese Modifizierungen waren die reinen RNA-Ribozyme Rb5/10 und Rb8/12.

Durch eine weitere Verkürzung der Flanken und DNA-Modifizierungen zeichnet sich das Ribozym Rb4/6V1 aus. Das Ribozym Rb5/10, das im vorhergehenden Vergleich nur eine geringe Aktivität aufwies, wurde zusätzlich synthetisiert.

Zunächst erfolgte ein Vergleich des Ribozyms Rb5/10 mit seinen DNA-modifizierten Varianten. Das Ribozym Rb4/6V1 wurde in diesen Vergleich mit einbezogen (Abb. 13).

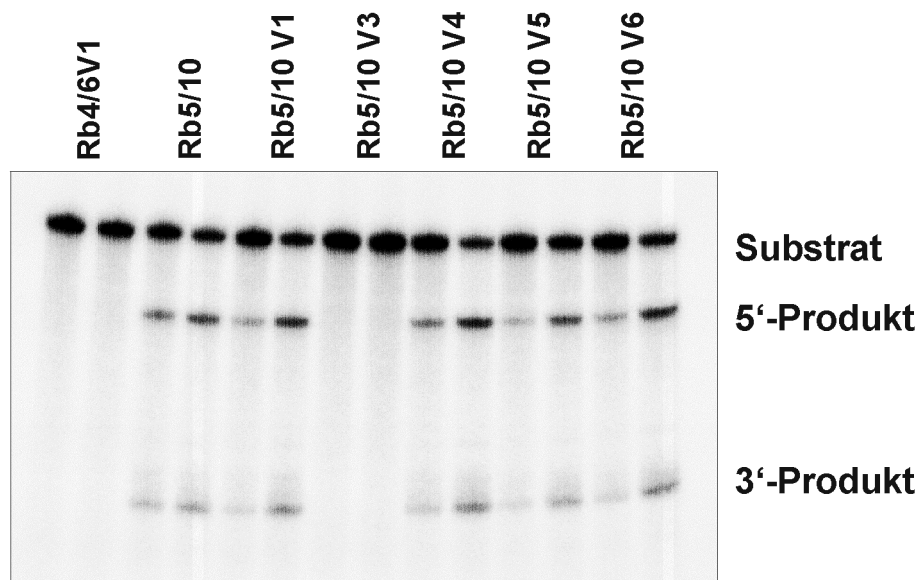


Abb. 13: Erster Vergleich DNA-modifizierter Ribozyme.

Für jedes Ribozym ist die Substratspaltung nach 10 und 120 Minuten gezeigt.

Hierbei zeigte sich, dass eine Verkürzung der Flanken auf insgesamt 10 Basen zum vollständigen Aktivitätsverlust des Ribozyms führt. Ausgehend vom Ribozym Rb5/10 wurden zunächst die Flanken DNA-modifiziert, was ohne drastische Aktivitätsverluste möglich war. Auch die Stammschleife kann weitgehend durch Desoxyribonukleotide aufgebaut werden.

Im Folgenden wurden die DNA-modifizierten Ribozyme verglichen, die in den Flanken 8 und 12 Basen aufweisen. Der Vergleich erfolgte zusammen mit den Ribozymen RbO und Rb8/12. Die Versuchsbedingungen waren mit denen im vorhergehenden Vergleich identisch (Abb. 14).

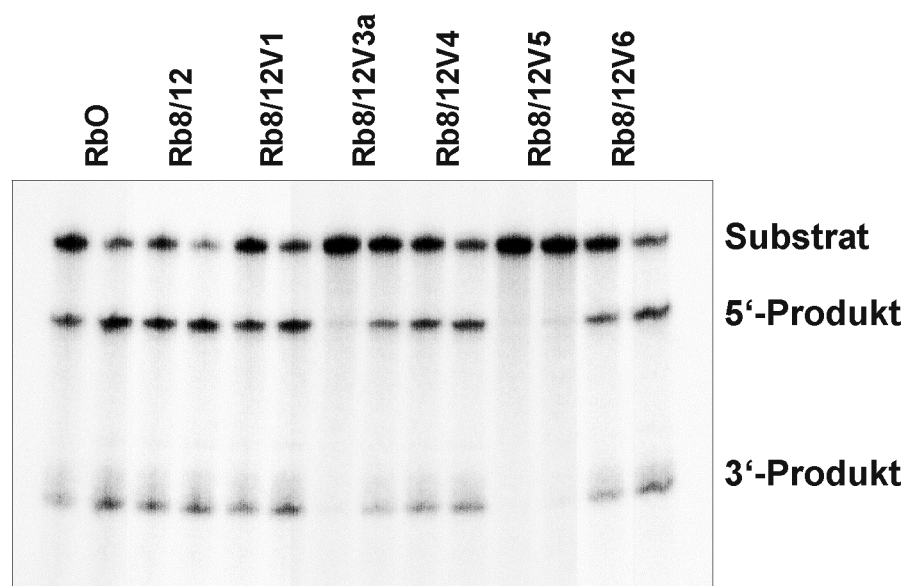


Abb. 14: Zweiter Vergleich DNA-modifizierter Ribozyme.

Es ist die Substratspaltung für die Ribozyme jeweils nach 10 und 120 Minuten dargestellt.

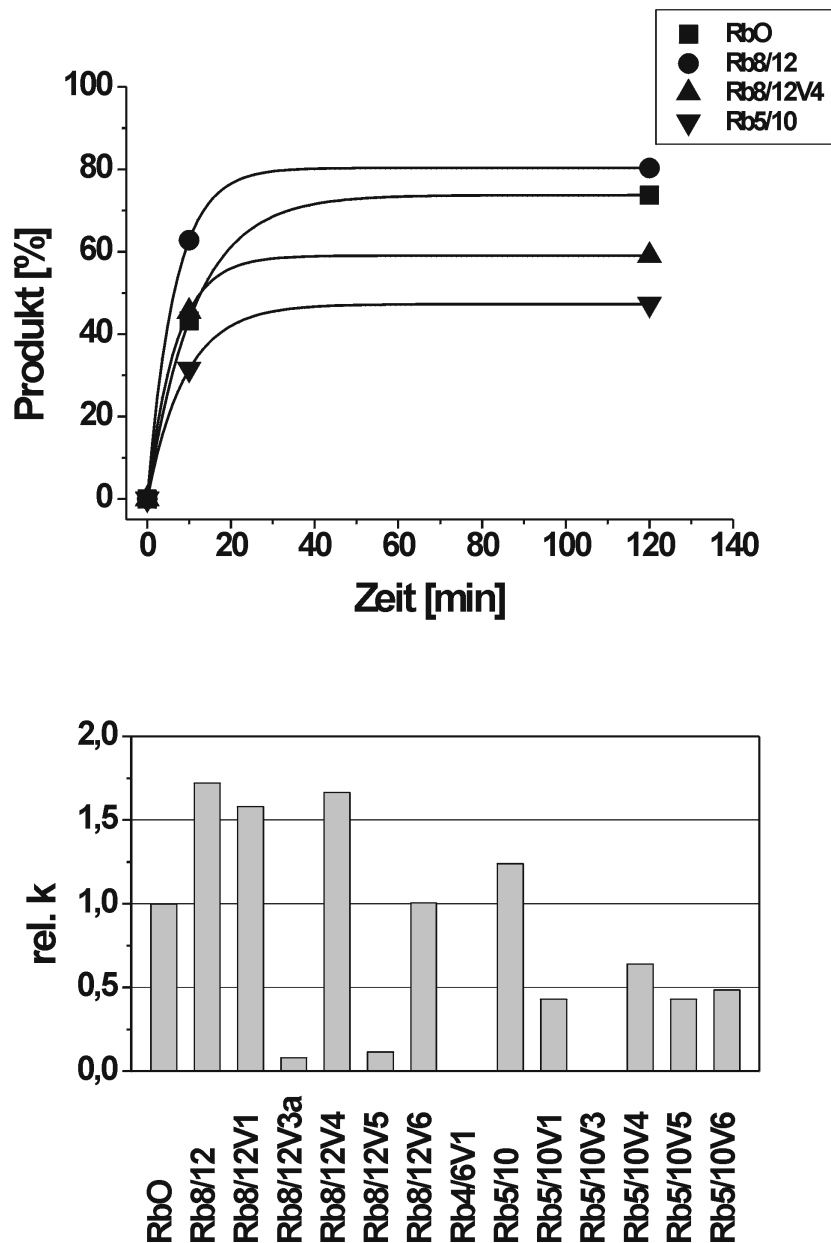


Abb. 15: Auswertung der Abbildung 13 und 14.

In der oberen Grafik sind die Kurven dargestellt, die die densitometrisch ermittelten Werte für die Substratspaltung nach 10 und 120 Minuten mit dem hypothetischen Nullwert (keine Spaltung bei $t = 0$) verbinden. Die Kurven folgen der Funktion $P_t = P_{\infty} - P_{\infty} \exp(-k t)$. Zur besseren Übersicht sind nur die Kurven der Ribozyme RbO, Rb8/12, Rb5/10 und Rb8/12V4 gezeichnet. Die Säulengrafik stellt für jedes Ribozym den Wert k im Verhältnis zum Wert k des Ribozyms RbO dar.

3.2.5 Modifizierung mit Phosphorothioaten

Für die Modifizierung mit Phosphorothioaten empfahl sich das Ribozym Rb8/12V4. Es besteht zu 71 % aus DNA und übertrifft in seiner Aktivität das Original-Ribozym RbO. Zunächst wurde das

Ribozym Rb8/12V4PT synthetisiert. Dieses weist gegenüber dem Ribozym Rb8/12V4 am 5'-Ende eine und am 3'-OH-Ende drei Modifizierungen mit Phosphorothioaten auf. In einem weiteren Syntheseschritt wurde Rb8/12V4PT am 3'-OH-Ende mit Fluorescein gekoppelt. Diese Modifikation ermöglichte den intrazellulären Nachweis des transfizierten Ribozyms RbF unter dem Mikroskop.

In der folgenden kinetischen Untersuchung wurden die Ribozyme Rb8/14V4, Rb8/12V4PT und RbF verglichen (Abb. 16).

Der Einbau von Phosphorothioaten in das Ribozym Rb8/12V4PT verursachte eine Aktivitätsminderung um 30 % gegenüber Rb8/12V4. Das fluoresceingekoppelte Ribozym RbF hat im Vergleich zum Ribozym Rb8/12V4 über 85 % der Aktivität verloren (Abb. 17).

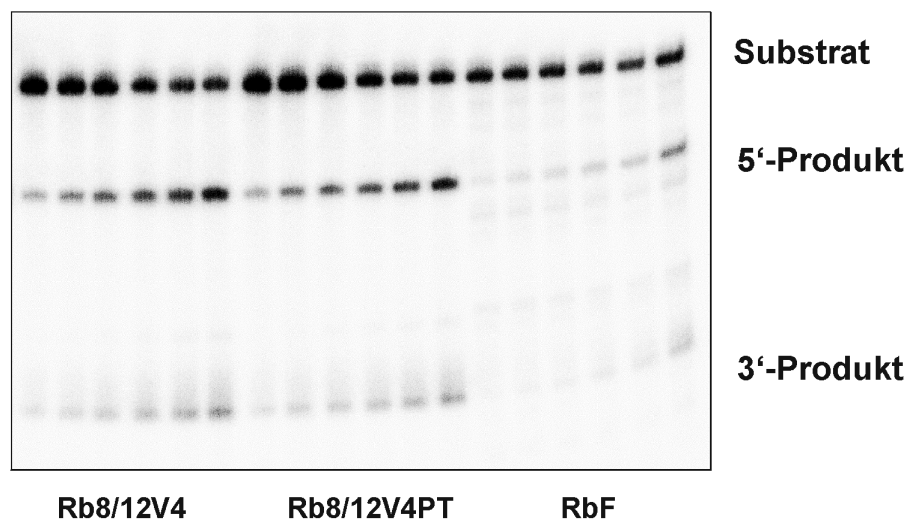


Abb. 16: Modifikationen des Ribozyms Rb8/12V4.

Dargestellt ist die Substratspaltung nach 0,5, 1,5, 3, 10, 30 und 120 Minuten.

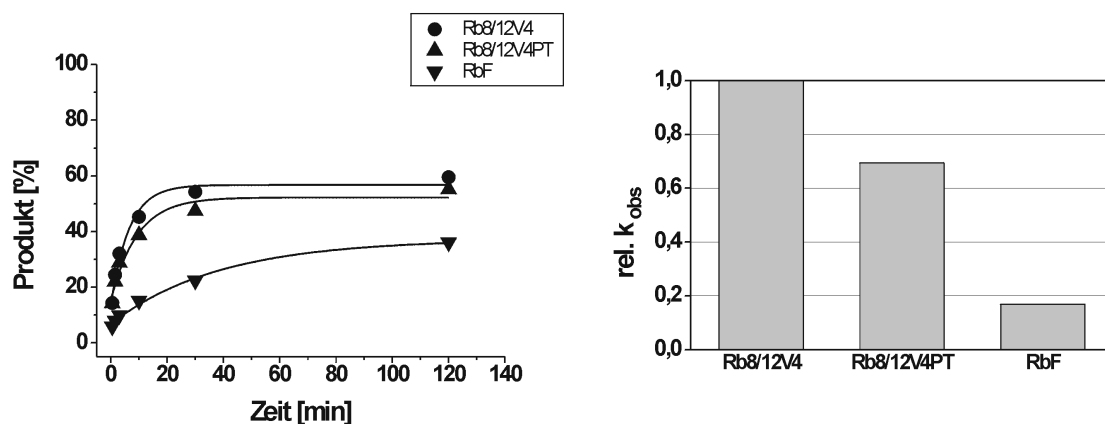


Abb. 17: Auswertung der Abbildung 16.

Die k_{obs} -Werte der Ribozyme sind im Säulendiagramm als relativ zum k_{obs} -Wert des Ribozyms Rb8/12V4 dargestellt.

3.2.6 Modifizierung mit Phosphorothioaten und Basenaustausch

Um eine Stabilisierung zu erreichen, wurden beim Ribozym RbS gegenüber Rb8/12V4PT' auch im Bereich der Stammschleife drei Phosphorothioatmodifikationen vorgenommen. Zudem erfolgte ein Austausch des Uracils an Position 13 gegen ein Adenin. Insgesamt wurde damit das Ribozym RbS gegenüber dem unmodifizierten Hammerhead-Ribozym RbO wie folgt verändert:

1. Verkürzung der Stammschleife und der Flanken
2. RNA-DNA-Austausch
3. Koppelung mit Phosphorothioaten
4. Basenaustausch in der Stammschleife

Im Vergleich zwischen dem Ribozym RbO und dem Ribozym RbS zeigte sich, dass ihre Aktivitäten trotz der umfangreichen Modifikationen nicht differierten. Mit $p = 0,743$ ($\alpha = 0,5$) ergab sich im t-Test für die k_{obs} -Werte der Ribozyme kein signifikanter Unterschied (Abb. 18 und Abb. 19).

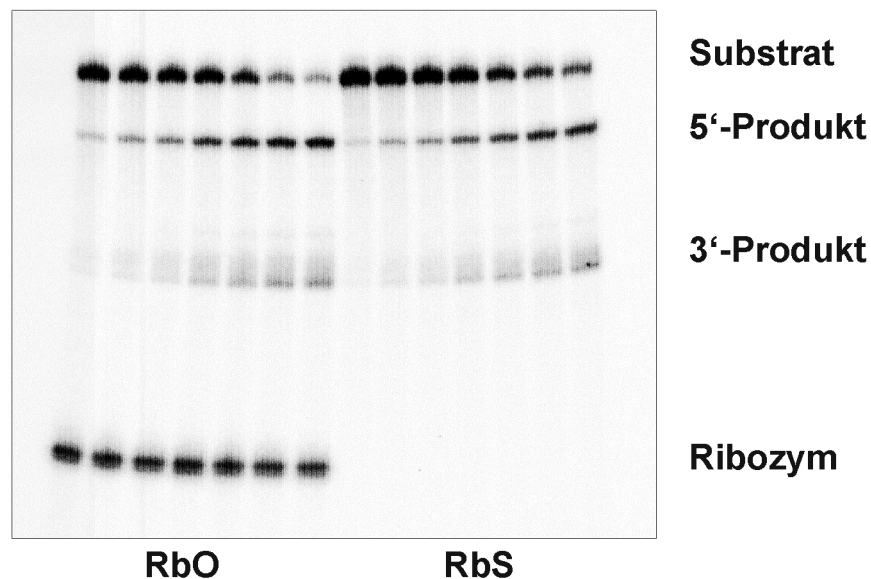


Abb. 18: Vergleich der Ribozyme RbO und RbS.

Die Abbildung zeigt die Substratspaltung der Ribozyme nach 0,5, 1,5, 3, 10, 30, 90 und 150 Minuten.

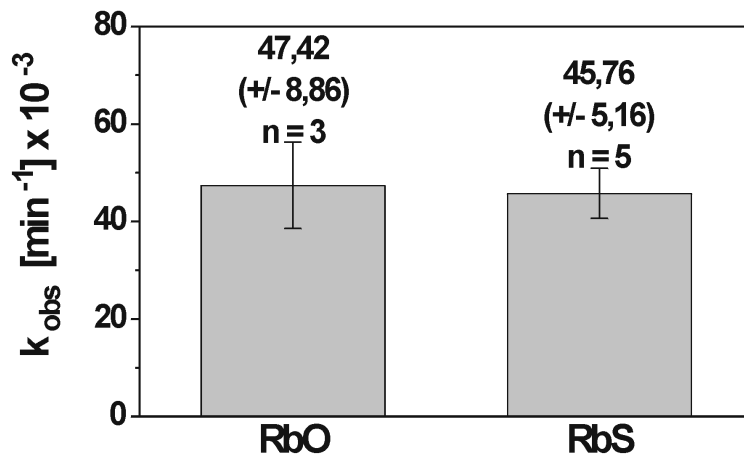


Abb. 19: Auswertung der Abbildung 18.

In der Säulengrafik sind die gemittelten k_{obs} -Werte für die Ribozyme RbO und RbS verzeichnet.

3.2.7 Kationisches Lipid

Die Transfektion der Zellen mit dem stabilisierten Ribozym sollte mit Hilfe eines kationischen Lipids erfolgen. In einer kinetischen Untersuchung wurde zuvor dessen Einfluss auf die katalytische Aktivität überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass sich die Aktivität des Ribozyms RbS nach Zugabe eines Lipids zum Reaktionsansatz um 20 % verringerte (Abb. 20).

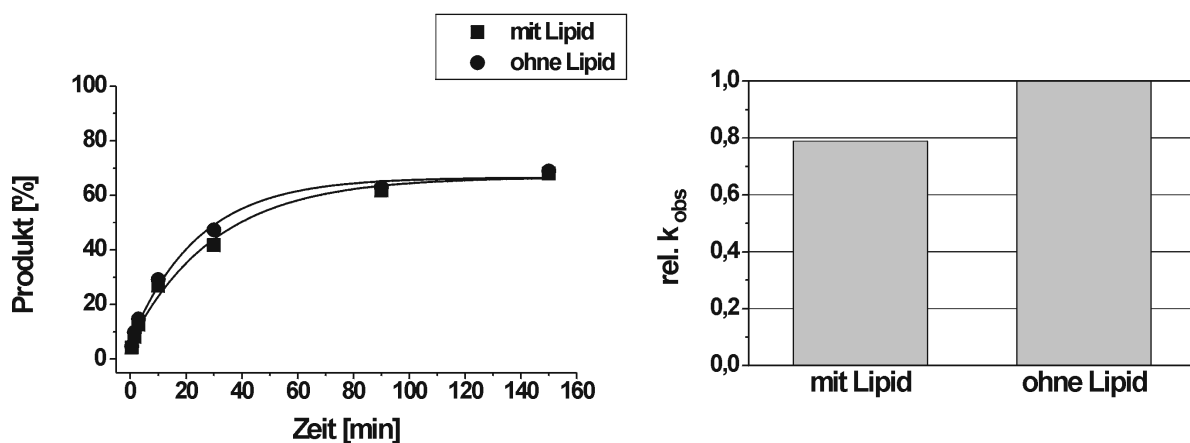


Abb. 20: Einfluss eines kationischen Lipids auf die Aktivität des Ribozyms RbS.

3.2.8 Kontrollribozym RbSSc

Die Behandlung der Zellen mit dem stabilisierten Ribozym kann durch unspezifische Effekte eine Verringerung der PTHrP-Sekretion hervorrufen. Um diese von der erwünschten Wirkung des Ribozyms unterscheiden zu können, wurde ein weiteres Ribozym (RbSSc) erstellt. Es besitzt im Gegensatz zum Ribozym RbS Flanken, deren Sequenzen nicht komplementär zur Substrat-RNA sind. Die Flanken verfügen rechnerisch über die gleichen Basen, sind jedoch durch das Vertauschen der Basen in ihrer Sequenz verändert. Im Test zeigte dieses Ribozym keine Aktivität (Abb. 21).

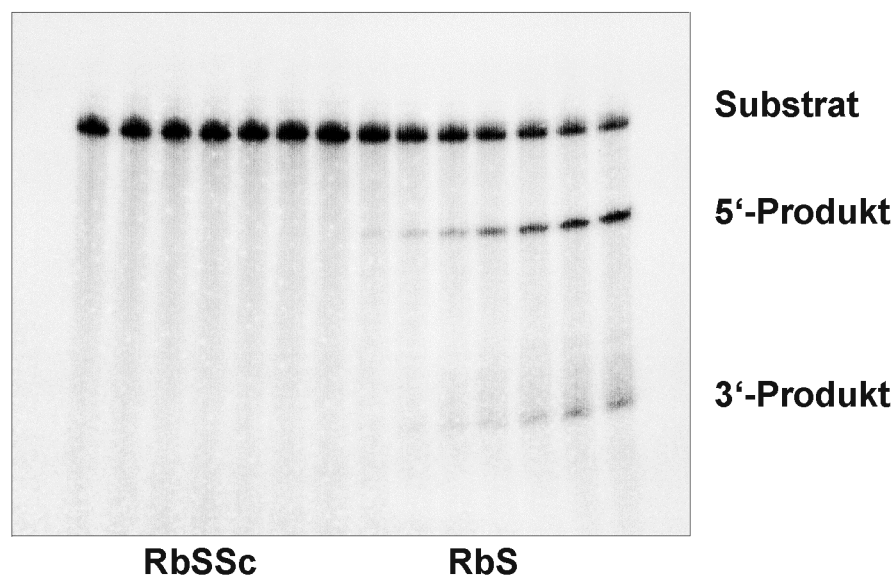


Abb. 21: Vergleich des Kontrollribozyms RbSSc mit dem stabilisierten Ribozym.
Es ist die Substratspaltung nach 0,5, 1,5, 3, 10, 30, 90 und 150 Minuten dargestellt.

3.3 Stabilitätstest

Die metabolische Stabilität des Ribozyms RbS gegenüber dem unmodifizierten Ribozym RbO wurde in 1 %igem Kälberserum (FCS) getestet. In der FCS-Lösung lagen die Ribozyme in einer Konzentration von 1 μ M vor. Die Auswertung des Stabilitätstests ergab für das Ribozym RbS eine Halbwertszeit von mehr als 10 Stunden. Sie war gegenüber der für das Ribozym RbO ermittelten Halbwertszeit (ca. eine Stunde) über das Zehnfache erhöht.

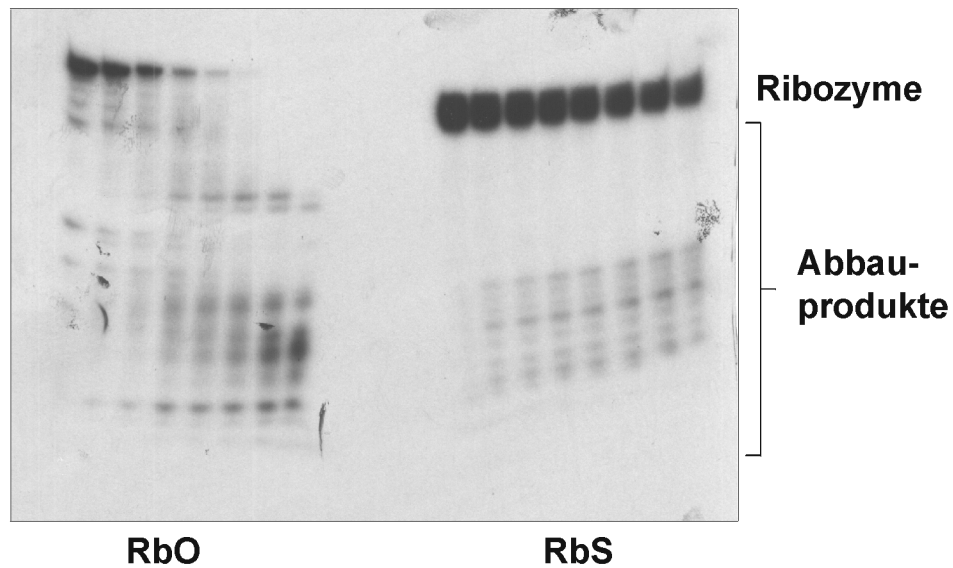


Abb. 22: Stabilität von RbO und RbS im Serum.

Es ist der Abbau der Ribozyme nach einer Minute sowie nach 0,5, 1, 2, 4, 6 und 10 Stunden abgebildet. Um das Ribozym RbS und dessen Abbauprodukte autoradiografisch darstellen zu können, erfolgte vor dem Versuch eine radioaktive 5'-End-Markierung des Ribozyms.

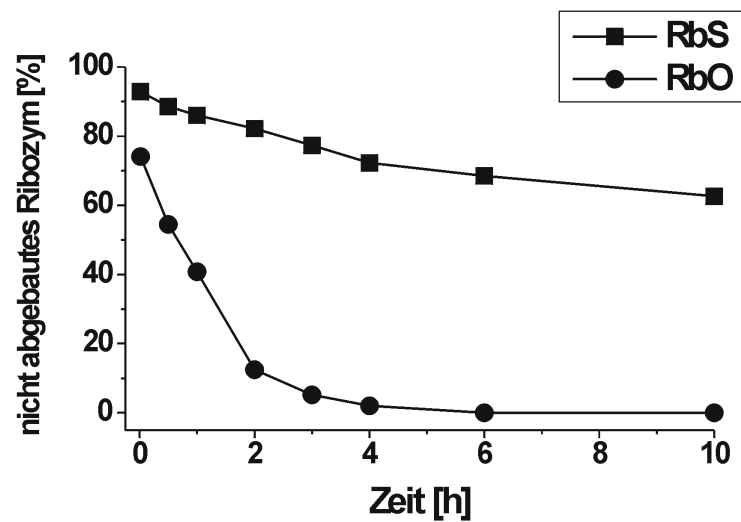


Abb. 23: Auswertung der Abbildung 22.

3.4 Transfektion

Vor der Behandlung der Tumorzellen in Monolayer-Zellkultur durch lipidvermittelte Transfektion mit dem stabilisierten Ribozym, wurden in Transfektionsversuchen acht verschiedene kationische Lipide des PerFect Lipid Transfection Kit (Invitrogen) zusammen mit dem Ribozym RbF getestet.

Der Nachweis des fluoresceinmarkierten Ribozyms RbF in den Zellen erfolgte an einem konfokalen Mikroskop. Für die Zellbehandlung wurde das Lipid 6 des PerFect Lipid Transfection Kit ausgewählt, da es die stärkste diffus zytoplasmatische Verteilung des Ribozyms bedingte (Abb. 24).

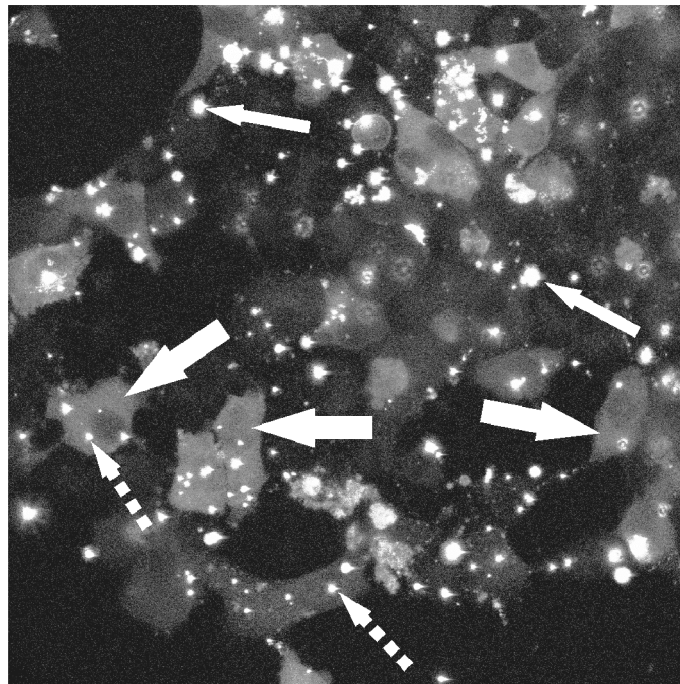


Abb. 24: Transfektion.

Die Abbildung zeigt Zellen des Nierenzellkarzinoms RCC 95/96 nach lipidvermittelter Transfektion mit dem Ribozym RbF. Das Ribozym stellt sich im Zytoplasma als diffuse Färbung dar (dicke Pfeile). Darüber hinaus existiert es im Zytoplasma innerhalb liposomaler Einschlüsse (gepunktete Pfeile) und außerhalb der Zellen in größeren Lipid-Ribozym-Komplexen (dünne Pfeile).

3.5 Behandlung der Zellen

3.5.1 Ribozym RbS und RbSSc

Um die Wirksamkeit des stabilisierten Ribozyms RbS *in vivo* zu überprüfen, wurden mit diesem Zellen des Nierenzellkarzinoms RCC 95/96 in Monolayer-Zellkultur behandelt. Parallel dazu erfolgte eine Kontrollbehandlung der Zellen mit dem Ribozym RbSSc. Das ebenfalls stabilisierte Ribozym RbSSc kann sich auf Grund inkomplementärer Flanken nicht an die PTHrP-mRNA binden. Es besitzt somit gegenüber der PTHrP-mRNA keine katalytische Aktivität.

Die Ribozyme lagen in dem Transfektionsmedium in einer Konzentration von 166 nM vor. In Bezug auf das Kontrollribozym RbSSc ließ sich für das Ribozym RbS kein Effekt nachweisen. Die in den 60 Minuten nach der Behandlung (2. Wert) gemessenen PTHrP-Sekretionen waren mit $p = 0,706$ ($\alpha = 0,5$) nicht signifikant verschieden (Abb. 25).

In einem weiteren Versuch wurden die Zellen nochmals zum einen in der vorher genannten und zu anderen in der fünffach höheren Konzentration mit Ribozymen und Lipid behandelt. Es zeigte sich nach der Behandlung mit den höheren Ribozym- und Lipidkonzentrationen eine Verringerung der PTHrP-Sekretion. Jedoch konnte auch in diesem Fall kein signifikanter Unterschied (2. Wert: $p = 0,365$ ($\alpha = 0,5$)) hinsichtlich der Sekretion von PTHrP zwischen der Behandlung mit dem Ribozym RbS und dem Kontrollribozym RbSSc festgestellt werden.

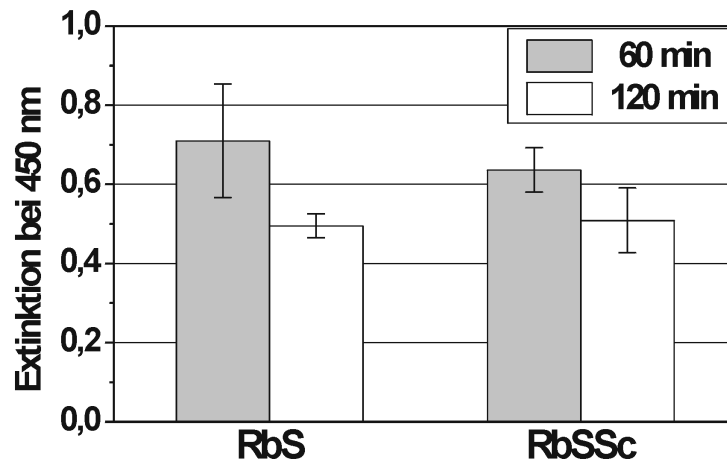


Abb. 25: Behandlung mit dem Ribozym RbS und dem Kontrollribozym.

Dargestellt sind die nach 60 und 120 Minuten gemessenen Extinktionen bei 450 nm. Der 60 Minuten-Wert entspricht der Sekretion während der einstündigen Behandlung mit den Ribozymen und der 120 Minuten-Wert der Sekretion in den 60 Minuten nach der Behandlung.

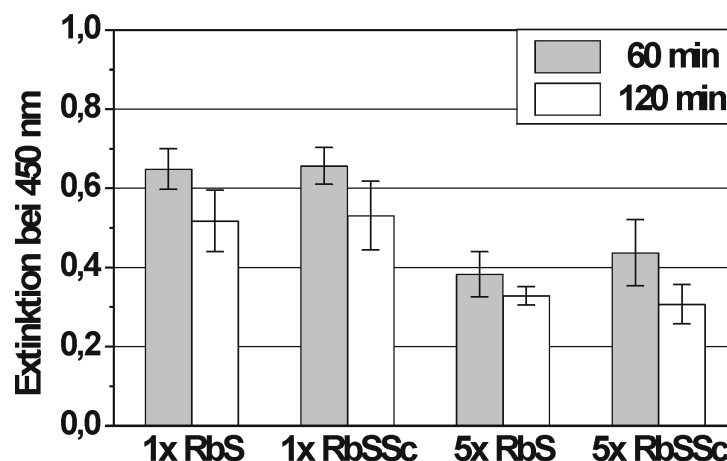


Abb. 26: Behandlung mit erhöhten Ribozym- und Lipidkonzentrationen.

Das Prinzip der Darstellung entspricht dem in Abbildung 25.

3.5.2 Antisense-Oligonukleotid

Antisense-Oligonukleotide können in Zellen durch Bindung an mRNA zur Verringerung der Expression des entsprechenden Gens führen. Die Behandlung der Zellen mit dem Antisense-Oligonukleotid ASO8/12 sollte diesen möglichen Effekt für die PTHrP-Sekretion nachweisen.

In einem Versuch wurden die Zellen mit dem Ribozym RbS oder dem ASO8/12 behandelt. Beide lagen in Konzentrationen von 1 μM vor. Auf die Zugabe von einem Lipid im Behandlungsmedium wurde verzichtet.

Gegenüber der Kontrollsekretion (K) sind für die Behandlung mit dem Ribozym und dem Antisense-Oligonukleotid keine signifikanten Unterschiede gemessen worden (Abb. 27).

Eine Erhöhung der Konzentration des Antisense-Oligonukleotid (bis 10 μM) führte zu keiner Verringerung der PTHrP-Sekretion (Abb. 28).

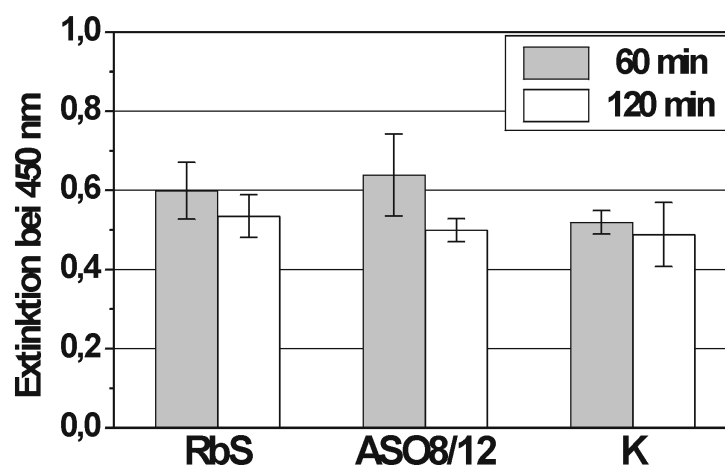


Abb. 27: Behandlung mit dem Ribozym RbS und dem Antisense-Oligonukleotid.
Das Prinzip der Darstellung entspricht dem in Abbildung 25.

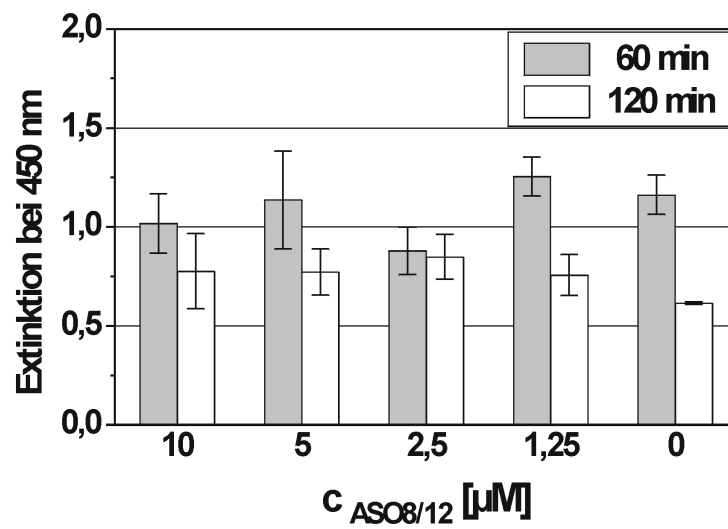


Abb. 28: Behandlung mit hohen Antisense-Oligonukleotid-Konzentrationen.
Das Prinzip der Darstellung entspricht dem in Abbildung 25.

4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte schrittweise ein Ribozym gegen die PTHrP-mRNA entwickelt werden. Um es für die Behandlung von Tumorzellen in Monolayer-Zellkultur einsetzen zu können, waren verschiedenen Modifikationen am Ribozym notwendig. Die strukturellen und chemischen Abänderungen des Ausgangsribozyms sollten bei gewahrter katalytischer Aktivität zu einer erhöhten Nukleasenstabilität führen.

Die Laborarbeit gliederte sich methodisch in folgende Schwerpunkte:

- Substrat- und Ribozymherstellung
- Kinetik-Tests
- Stabilitätstest
- Behandlung der Zellen.

Am Anfang standen vorbereitende Arbeiten, die dem Herstellen der Ribozyme und der Substrat-RNA dienten. Dabei erwies es sich als problematisch, die radioaktiv markierten RNA-Stränge in für die Ribozymkinetik ausreichender Menge und Reinheit zu erzeugen.

Als der entscheidende Abschnitt dieser Arbeit sind die kinetischen Untersuchungen anzusehen. Mit ihrer Hilfe war es möglich, die unterschiedlich modifizierten Ribozyme zu differenzieren und die Einflüsse der verschiedenen Modifikationen auf die katalytische Aktivität zu untersuchen.

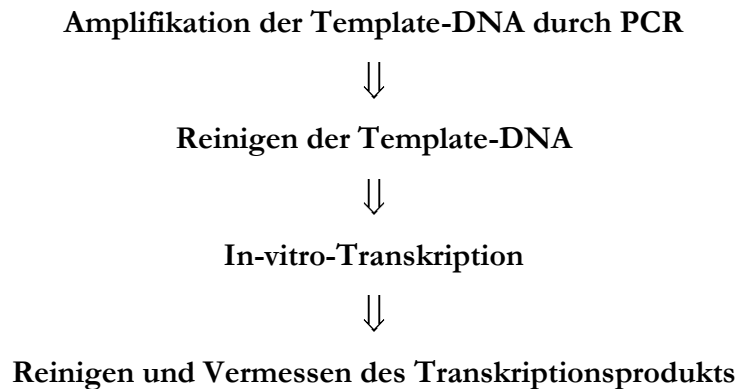
Vor den Zellversuchen wurde das Ribozym RbS - es stellte das Ergebnis der Entwicklung dar - auf seine metabolische Stabilität getestet.

Die Behandlung der Zellen des Nierenzellkarzinoms RCC 95/96 mit dem Ribozym RbS beendete die experimentelle Phase der Arbeit.

4.1 Substrat-RNA und RNA-Ribozyme

Da die kinetischen Untersuchungen unter single-turnover-Bedingungen im Bereich von 1 μM erfolgten, wurde eine beträchtliche Menge der 232 Basen langen Substrat-RNA benötigt. Diese Synthesemenge war durch die In-vitro-Transkription nur zu erreichen, wenn bei dieser Reaktion mindestens 20 μg Template-DNA eingesetzt wurden.

Im Folgenden sind die Syntheseschritte der Substrat-RNA zusammengefasst:



Um die Menge an amplifizierter DNA bei der PCR zu erhöhen, wurde die Reaktion optimiert. Das gelang zum einen durch Verkürzen des PCR-Templates von 413 auf 252 Basen. Die zu diesem Zweck erforderliche Primer-DNA wurde mit der Oligo-Software ermittelt. Neben der höheren PCR-Ausbeute führte die Verkürzung später zusätzlich zu einer höheren Transkriptionseffizienz.

Zum anderen wurden die Annealing-Temperatur und die Zyklenzahl angepasst. Hilfreich war hierfür neben durchgeführten Testreihen die Oligo-Software, mit der sich eine Richttemperatur ermitteln ließ. Die optimierte PCR zeigte im Kontrollgel nur geringe Degradationsprodukte und keine Fehlbanden (Abb. 5).

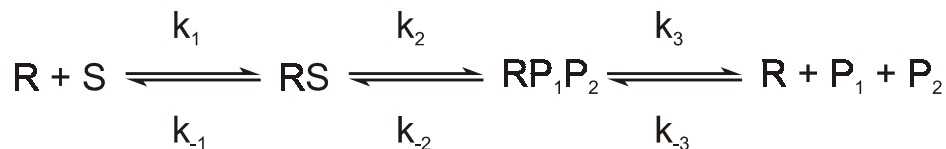
Die Reinigung des PCR-Produkts von Proteinen (DNA-Polymerase) und Nukleotiden hatte einen maßgeblichen Einfluss auf das Gelingen der In-vitro-Transkription. Es konnte festgestellt werden, dass ein zweimaliges Ausschütteln des PCR-Ansatzes mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol gegenüber einem einmaligen zu einer deutlich höheren Transkriptionseffizienz führt. Bei einem Einsatz von ungereinigter Template-DNA in der In-vitro-Transkription war das Reaktionsprodukt im PAA-Gel nicht klar von degradierten oder nicht vollständig synthetisierten Produkten abzugrenzen.

Für die weitere Verwendung der Substrat-RNA und der Ribozyme in den Kinetikuntersuchungen war es notwendig, sie im Anschluss an die Transkription von zusätzlich transkribierten Fehlbanden, von Template-DNA, Proteinen und Degradationen zu selektieren. Dabei kam es insbesondere darauf an, die entsprechenden Banden der Transkriptionsprodukte aus dem PAA-Gel präzise herauszuschneiden. Nur so konnte gewährleistet werden, dass die spätere Mengenbestimmung und die kinetischen Tests nicht durch Doppelbanden verfälscht wurden.

4.2 Ribozymkinetik

Die Reaktionsgeschwindigkeit von chemischen Prozessen lässt sich in vielen Fällen durch spezielle Substanzen regulieren. Dabei bleiben die Katalysatoren - so werden diese Substanzen bezeichnet - während der Reaktion in ihrer Struktur und Menge erhalten. Für die Katalysatoren in biologischen Systemen wurden die Begriffe Biokatalysator bzw. Enzym geprägt. Sie werden in der Mehrzahl durch intrazelluläre Proteine verkörpert, die monomer, oligomer, einfach oder komplex strukturiert sind. Aber auch für einige Ribonukleinsäuren, Ribozyme genannt, wurde enzymatische Aktivität nachgewiesen (Cech 1986).

Die Reaktionskinetik der von Ribozymen katalysierten Reaktionen gleicht der anderer Enzymsysteme. So lässt sich die enzymatische Reaktion allgemein durch folgende Gleichung wiedergeben (Hendry et al. 1992):



Die Gleichgewichtskonstante K des ersten Reaktionsschritts ergibt sich aus dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten für Substratassoziation und -dissoziation ($K = k_1 / k_{-1}$). Im zweiten Schritt, auch als chemischer Schritt bezeichnet, findet die eigentliche Substratspaltung statt. Ihre Geschwindigkeit wird mit der Konstante k_2 beschrieben. Sie ist von der Konzentration der Reaktionskomponenten (Substrat $[S]$, Ribozym $[R]$) unabhängig. Die entsprechende Rückreaktion ist zu vernachlässigen.

Der letzte Schritt umfasst die Produktdissoziation. Er könnte auch in zwei weitere, parallel verlaufende Zwischenschritte untergliedert werden ($\text{RP}_1 + \text{P}_2$ oder $\text{RP}_2 + \text{P}_1$). Als eine Besonderheit der ribozymkatalysierten Reaktionen ist dabei die starke Bindung zwischen komplementären RNA-Strängen herauszustellen. Sie kann den letzten Reaktionsschritt zu einem die Gesamtreaktion limitierenden Schritt werden lassen (McConnell 1997).

Entsprechend anderen Enzymen können Ribozyme durch die katalytische Konstanten K_m , k_{cat} und k_{cat}/K_m näher charakterisiert werden. Die Werte ergeben sich aus der klassischen Michaelis-Menten-Kinetik. Diese geht davon aus, dass bei konstanter Enzymmenge die Substratkonzentration schrittweise angehoben wird. Mit dem Anstieg des Enzym-Substrat-Komplexes (ES) nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit (initialer Substratumsatz) zu. Wird die Reaktionsgeschwindigkeit im Koordinatensystem als Funktion der Substratkonzentration aufgetragen, erhält man eine hyperbolische Kurve, die sich asymptotisch der Maximalgeschwindigkeit V_{max} nähert. Bei maximalem initialen Substratumsatz liegt die gesamte Enzymmenge als Enzym-Substrat-Komplex vor. Die dann bestehende Sub-

stratsättigung bedingt, dass die Geschwindigkeit nur durch eine Erhöhung der Enzymkonzentration zu steigern ist.

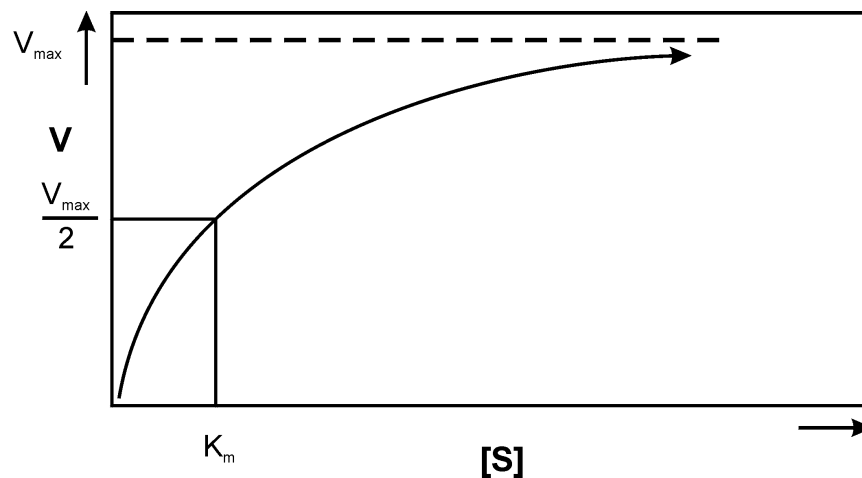


Abb. 29: Michaelis-Menten-Kinetik.

Die Konzentration des Substrats, die zur Sättigung führt, ist für jedes Enzym verschieden. Da sich jedoch die experimentelle Bestimmung der Sättigungskonzentration als schwierig erwies, führten Michaelis und Menten (1913) den standardisierten Wert K_m ein. Der auch als Michaeliskonstante bezeichnete K_m -Wert entspricht der Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit. Er stellt somit die Substratkonzentration dar, bei der die Hälfte des vorhandenen Enzyms mit Substrat gesättigt ist (Abb. 29).

Mit Hilfe des K_m -Werts lassen sich Aussagen über die Substrataffinität des Enzyms treffen. Ist der K_m -Wert hoch, bedeutet es, dass eine große Substratmenge zur Sättigung des Enzyms erforderlich ist. Das Enzym besitzt eine geringe Affinität zum Substrat. Analog ergibt sich für ein starkes Bindungsbestreben zwischen Enzym und Substrat ein geringer K_m -Wert.

Der k_{cat} -Wert, in älterer Literatur auch als Wechselzahl (turnover number) bezeichnet, gibt die molare katalytische Aktivität des Enzyms an. Er entspricht dem Quotienten aus gemessener Maximalgeschwindigkeit V_{\max} und der eingesetzten Enzymmenge. Dieser für jedes Enzym spezifische Wert besitzt die Dimensionen s^{-1} oder min^{-1} . Er gibt an, wie viel Substratmoleküle in der Zeiteinheit von einem Enzymmolekül bzw. einem katalytischen Zentrum bei Substratsättigung umgesetzt werden. In der Michaelis-Menten-Kinetik entspricht der k_{cat} -Wert der Geschwindigkeitskonstante für den chemischen Schritt.

Aus dem K_m und k_{cat} -Wert errechnet sich die katalytische Effizienz eines Enzyms. Der auch als Spezifitätskonstante bezeichnete Term k_{cat}/K_m ist besonders für den Vergleich von verschiedenen Substraten eines Enzyms oder von mehreren Enzymen, die dasselbe Substrat umsetzen, geeignet.

Je nachdem, welche Reaktionskomponente - Substrat oder Ribozym - im Vergleich zur jeweils anderen im Überschuss vorliegt, wird zwischen Reaktionen unter multiple- oder single-turnover Bedingungen unterschieden. Multiple-turnover Reaktionen erfolgen unter Substratüberschuss. Dabei wird festgestellt, ob ein Ribozym in der Lage ist, mehrere Substratmoleküle zu spalten. Unter diesen Reaktionsbedingungen können alle Reaktionsschritte, insbesondere die Produktdissoziation, den Reaktionsumsatz limitieren. Durch eine Balance zwischen Bildung und Zerfall des Ribozym-Substrat-Komplexes (RS) wird über einen längeren Zeitraum der Reaktion sowohl die RS-Konzentration als auch die freie Ribozympopulation konstant gehalten (steady state).

Bei single-turnover-Reaktionen liegt das Ribozym im Überschuss vor. Dies macht es wahrscheinlich, dass ein Ribozym die Spaltung von nicht mehr als einem Substratmolekül katalysiert. Die Produktdissoziation spielt deshalb als reaktionslimitierender Faktor keine Rolle. Vielmehr sind nur die ersten beiden Reaktionsschritte, nämlich die Bildung des RS-Komplexes und die Spaltungsreaktion, für den Reaktionsumsatz entscheidend.

Die Entscheidung für eine der beiden genannten Formen der Reaktionskinetik ist in erster Linie von den Strukturen der Reaktionspartner abhängig. Um die Effektivität verschiedener Ribozyme bei der Spaltung einer kurzen Substrat-RNA zu vergleichen, sind Reaktionen unter multiple-turnover-Bedingungen gut geeignet. Dazu werden mit Hilfe der Michaelis-Menten-Kinetik die katalytischen Konstanten k_{cat} , K_m und k_{cat}/K_m ermittelt.

Für die Spaltung längerer Substrate spielen Sekundärstrukturen der RNA-Stränge eine wichtige Rolle. Sie können zu einer erheblichen Verminderung der katalytischen Effizienz führen. So ergaben sich für die Spaltung der LTR¹ RNA des HIV Typ1 (ca. 1.000 Basen) im Vergleich zur Spaltung kurzer synthetischer Substrate (19 Basen) um mindestens drei Größenordnungen niedrigere k_{cat}/K_m -Werte (Heidenreich und Eckstein 1992). Der Grund für den geringen Umsatz unter Substratüberschuss könnten starke Sekundärstrukturen, insbesondere doppelsträngige und haarnadelförmige, im Bereich und in der Nähe der Zielsequenz sein. Ebenfalls wäre es denkbar, dass die Erreichbarkeit der Zielsequenz für das Ribozym durch Sekundärstrukturen eingeschränkt wird. Ein herabgesetztes Bindungsvermögen eines Ribozyms an ein langes Substrat konnte durch ein Absinken des K_m -Wertes nachgewiesen werden. Die chemische Umsetzung des Substrats - durch den k_{cat} -Wert charakterisiert - wurde dabei nicht beeinflusst (Fedor und Uhlenbeck 1990). Neben den Sekundärstrukturen würde auch die Bildung von irregulären Ribozym-Substrat-Komplexen zu einem vermin-

¹ LTR = long terminal repeats, Steuersequenz

derden Substratumsatz führen. Um trotz langer Substrate einen ausreichenden Umsatz zu gewährleisten, ist es erforderlich, die Ribozymkonzentration im Verhältnis zur Substratkonzentration anzuheben. Single-turnover-Reaktionen, in denen das Ribozym im Überschuss vorliegt, gelten daher als Mittel der Wahl für die Spaltung längerer Substrate.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Ribozyme hinsichtlich ihrer Aktivität in zellfreien Versuchen untersucht. Die In-vitro-Spaltung eines 232 Basen umfassenden Abschnitts des Exon III und IV der PTHrP mRNA erfolgte dabei unter single-turnover-Bedingungen. Anfängliche Tests, die unter Überschuss des Substrats zum Ribozym stattfanden, ergaben nur einen geringen Umsatz. Der Versuchsaufbau, der den Arbeiten von Hendry und McCall (1992, 1995a und b) entlehnt wurde, gestattete es hingegen, dass für die meisten der untersuchten Ribozyme ein gut messbarer Umsatz nachgewiesen werden konnte. Für den Vergleich der Ribozyme wurde der k_{obs} -Wert, eine kinetische Konstante erster Ordnung, ermittelt. Dieser Wert entspricht der Geschwindigkeitskonstante k_2 , da durch die Vorinkubation des gesamten Reaktionsansatzes in Abwesenheit von Magnesium der reaktionslimitierende Schritt nicht die Bildung des Ribozym-Substrat-Komplexes (k_1), sondern die Spaltung des Substrats ist. Sehr einflussreich auf die ermittelten k_{obs} -Werte waren die Zeitpunkte der Probenentnahmen (2.2.4.1). Es ergaben sich systematisch höhere Werte, je näher die erste Entnahme am Zeitpunkt t_0 ($t = 0$) lag, bzw. systematisch zu niedrige Werte, je weiter die erste Probenentnahme herausgezögert wurde. Die Entnahme einer Probe zum Zeitpunkt t_0 war technisch nicht möglich, so dass die ermittelten k_{obs} -Werte nur Näherungswerte an den absoluten Wert sein können. Die katalytischen Konstanten der Michaelis-Menten-Kinetik k_{cat} , K_m und k_{cat}/K_m ließen sich unter single-turnover-Bedingungen nicht bestimmen.

4.2.1 Das Hammerhead-Ribozym RbO

Zu Beginn der kinetischen Untersuchungen wurde der k_{obs} -Wert für das Hammerhead-Ribozym RbO, das der Entwicklung weiterer Ribozyme zu Grunde lag, bestimmt. Der gemittelte Wert für die Spaltung der 232 Basen langen Substrat-RNA betrug $0,047 \text{ min}^{-1}$. Hendry und McCall ermittelten in ihrer Arbeit (1992) für die Ribozyme 1 und 2 mit $1,6 \text{ min}^{-1} (\pm 0,6)$ und $5,0 \text{ min}^{-1} (\pm 1,0)$ um bis zu 100 mal höhere k_2 -Werte². Ein mit $0,24 \text{ min}^{-1} (\pm 0,05)$ lediglich fünffach höherer k_{obs} -Wert wurde von ihnen in einer weiteren Arbeit (1995a) für das Ribozym TAT RA angegeben. Der direkte Ver-

² In folgenden Arbeiten von Hendry wurden die k_2 -Werte als k_{obs} -Werte bezeichnet.

gleich der Werte ist jedoch nur bedingt zulässig, da in den Untersuchungen von Hendry und McCall vergleichsweise kurze Substrate (13 Basen) gespalten wurden.

Eine Spaltung längerer Substrate wurde von Jankowsky und Schwenzer (1996) durchgeführt. Das Ziel ihrer Untersuchungen war es, die Spaltung von Substraten unterschiedlicher Länge im Beisein von Facilitatoren-RNA und -DNA zu untersuchen. Als Substrat-RNA wurden drei Domäne der HTF³ mRNA mit 39, 452 und 942 Basen eingesetzt. Die Reaktionen wurden durch ein 32 Basen langes Hammerhead-Ribozym katalysiert. Im Folgenden sind die von Jankowsky und Schwenzer ermittelten k_2 -Werte (entsprechen k_{obs}) aufgeführt, die ohne Anwendung von Facilitatoren ermittelt wurden.

k_2 S	39	=	2,3	min^{-1}	($\pm 0,3$)
k_2 S	452	=	0,057	min^{-1}	($\pm 0,003$)
k_2 S	942	=	0,0185	min^{-1}	($\pm 0,002$)

Es ist ersichtlich, dass das kurze Substrat S 39 nahezu 125 mal schneller gespalten wird als das Substrat S 942. Diese Werte verdeutlichen, welchen Einfluss die Länge des Substrats auf die Spaltung hat. Mit $0,057 \text{ min}^{-1}$ liegt die Geschwindigkeitskonstante k_2 für die Spaltung des Substrats S 452 im Bereich des k_{obs} -Werts des Ribozyms RbO. Jedoch ist auch hier ein direkter Vergleich der Werte nur eingeschränkt möglich, da zum einen die Größe der Substrate nicht identisch ist und zum anderen die Substratlänge nur ein Hinweis auf mögliche Sekundärstrukturen sein kann.

Parallel zum Ribozym RbO wurde das Ribozym RbM getestet. Beide Ribozyme sind bis auf zwei Abweichungen im Bereich der Stammschleife des Ribozyms RbM identisch. Der Austausch von zwei Basen in der konservierten Region der Stammschleife von RbM bedingte den vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität. Diese Tatsache untermauert die Feststellung, dass die konservierte Region eine wichtige Rolle für die Ribozymaktivität spielt. Manipulationen in diesem Bereich, sei es durch Basenaustausch, Phosphorthionatsubstitutionen oder andere Modifikationen, führen daher zu einer Abnahme oder dem Verlust der Aktivität (Ruffner et al. 1990).

4.2.2 Verkleinerung des Hammerhead-Ribozyms

In den voranstehenden Abschnitten wurde bereits darauf hingewiesen, dass die Länge der Substrat-RNA und die damit verbundenen mehr oder minder ausgeprägten Sekundärstrukturen erheblichen

³ HTF = human tissue factor

Einfluss auf die Spaltungsreaktion haben. Zweifellos ist aber auch die Struktur des Ribozyms für die Effizienz der Katalyse von Bedeutung. Obgleich die Struktur des Hammerhead-Ribozyms in gewissem Maß festgelegt ist, sind Variationen in bestimmten Abschnitten ohne Verlust der katalytischen Aktivität möglich.

In mehreren Arbeiten untersuchten Lange et al. (1994), Tuschl und Eckstein (1993), Hendry und McCall (1995 und 1996), inwiefern Größenänderungen der Ribozyme die Katalyse beeinflussen. Auf den Erkenntnissen basierend und ausgehend vom Hammerhead-Ribozym RbO wurden in dieser Arbeit weitere Ribozyme, die in Flanken und Stammschleife verkleinert wurden, erstellt (Abb. 30).

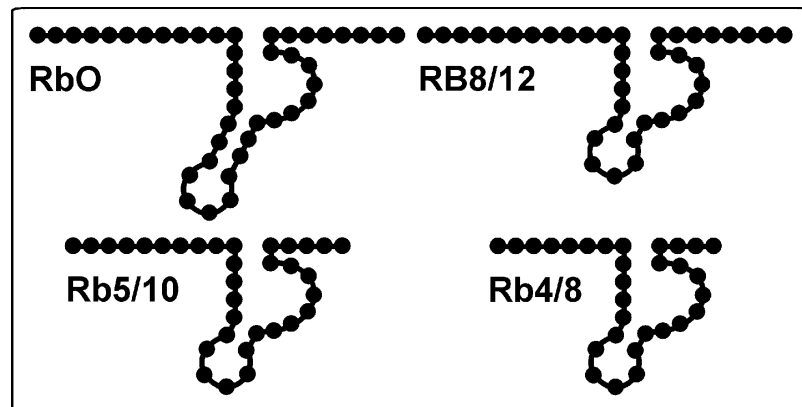


Abb. 30: Ribozymübersicht I.

Das Ribozym Rb8/12, das mit dem Ribozym RbO identische Flanken besitzt, wies bei der Spaltung der Substrat-RNA die höchste Aktivität auf. Die Tatsache, dass die kürzeren Flanken der Ribozyme Rb5/10 und Rb4/8 geringere Substratumsätze bewirkten, lässt vermuten, dass es für die Länge der Flanken ein Optimum bezüglich der Ribozymaktivität gibt. So ermittelten auch Lange et al. (1994) bei der Spaltung einer 501 Basen umfassenden Substrat-RNA durch Ribozyme mit unterschiedlichen Flanken (3'/5'-Flanken: 5/9, 7/9, 8/10 und 14/13) die höchste Effizienz für das Ribozym mit einer Flankenlänge von 7 und 9 Basen. Eine Bindungsschwäche der 3'-Flanke mit sich anschließender frühzeitiger Dissoziation vom Substrat wurde als Grund für die geringe Effizienz des 5/9er Ribozyms angenommen. Hendry und McCall (1995 und 1996) untersuchten den Einfluss der Flankenlänge auf die Katalyse anhand von Spaltungen kurzer Substrate (13 nt). Der Vergleich eines 10/10er mit einem 6/6er Ribozyms ergab deutliche Unterschiede hinsichtlich der ermittelten kinetischen Konstanten. Das kleinere Ribozym, bezeichnet als TAT RA 6X2, wies einen annähernd 20fach höheren k_{cat} -Wert und einen um zwei Drittel niedrigeren K_m -Wert auf. Die sich daraus ergebende katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) zeigt, dass das Ribozym mit den kürzeren Flanken das Substrat unter multiple-turnover-Bedingungen ca. 60 mal effektiver umsetzt. In gleicher Weise zeigte

sich das kleinere Ribozym in den Reaktionen, in denen es im Überschuss zum Substrat vorlag, als das aktivere. Der 40fach höhere k_{obs} -Wert demonstriert eine deutliche Zunahme der Spaltungsrate bei einer Verkürzung beider Flanken von 10 auf 6 Basen (Hendry und McCall 1995).

In einer weiteren Arbeit wiesen Hendry und McCall (1996) nach, dass die katalytische Aktivität von Ribozymen mit asymmetrischen Flanken größer ist, wenn sich die kürzere der beiden Flanken am 5'-Ende befindet. So wurde bei der Spaltung eines 21mer Substrats durch ein 5/10er und ein 10/5er Ribozym für das Verhältnis der ermittelten k_{obs} -Werte ein Faktor, der größer als 100 ist, errechnet. Um die Flankenlängen zu optimieren, variierten Hendry und McCall diese in weiteren Untersuchungen. Hierbei erkannten sie, dass eine Längenveränderung der 5'-Flanke einen größeren Effekt hervorruft als eine Änderung der Länge der 3'-Flanke.

Eine weitere Verkleinerung der Ribozyme ist durch die Einsparung von Basen im Bereich der Stammschleife möglich. In mehreren Arbeiten wurden Ribozyme erstellt, bei denen die Basen der Stammschleife, abgesehen von denen in den konservierten Regionen, teilweise oder vollständig entfernt wurden. Diese Ribozyme, von McCall et al. (1992) als Minizyme bezeichnet, verfügten bei der Spaltung kleiner Substrate unter multiple-turnover Bedingungen über eine geringere Aktivität als die Ribozyme mit kompletter Stammschleife. Dabei war die Aktivitätseinschränkung vom Ausmaß der Baseneinsparung abhängig (Tuschl und Eckstein 1993). Die Ribozyme, bei denen die Doppelhelix der Stammschleife lediglich von vier auf zwei Basenpaare verkleinert wurde, wiesen im Vergleich zum Ausgangsribozym ähnliche katalytische Werte auf. Bei einem vollständigen Verzicht auf die Doppelhelix sank die katalytische Effizienz der Ribozyme drastisch. Aber auch für die Basensequenz der Doppelhelix und der sich anschließenden Schleife wurde ein Einfluss auf die Ribozymaktivität nachgewiesen. So zeigte ein Ribozym mit kompletter, jedoch in der Sequenz der Doppelhelix veränderter Stammschleife eine 225fach geringere katalytische Effizienz gegenüber dem Ursprungsribozym. Das starke Absinken des k_{cat} -Werts ließ dabei auf die Bedeutung der Doppelhelix bei der Substratspaltung schließen. Für sie wurde eine stabilisierende Funktion von Übergangszuständen bei der Spaltung angenommen. Der unveränderte K_m -Wert deutete an, dass die Sequenzänderung die Bildung des Ribozym-Substrat-Komplexes nicht berührt (Tuschl und Eckstein 1993).

In Bezug auf die Stammschleifengröße konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Verkleinerung nicht zwangsläufig mit einer geringeren Ribozymaktivität einhergehen muss. Das Ribozym Rb8/12 erwies sich gegenüber RbO trotz kleinerer Stammschleife bei der Spaltung der Substrat-RNA als das aktivere. Allerdings wurde hier im Unterschied zu der Arbeit von Tuschl und Eckstein (1993) ein langes Substrat (232 gegenüber 12 Basen) unter single-turnover-Bedingungen gespalten. Insgesamt lassen sich aus der Verkleinerung von Hammerhead-Ribozymen folgende Vorteile ableiten. Bei der Spaltung von längeren Substraten können Ribozyme mit kürzeren Flanken und einer

verkleinerten Stammschleife einen höheren Umsatz bewirken als die entsprechenden „vollständigen“ Ribozyme. Dabei ist anzunehmen, dass dem Effekt das bessere Erreichen der Zielsequenzen selbst bei ausgeprägten Sekundärstrukturen zu Grunde liegt. Der Effekt lässt sich jedoch nicht vorhersagen und muss daher durch Austesten herausgestellt werden. Ein weiterer Vorteil besteht in der erleichterten Handhabung verkleinerter Ribozyme. Sie weisen weniger Angriffspunkte für Nukleasen auf und lassen sich besser in Zellen transfizieren. Ein nicht zu unterschätzender Vorteil sind ferner die geringeren Synthesekosten.

4.2.3 Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die katalytische Aktivität des Ribozyms Rb8/12

Aus den Versuchen mit in Stammschleife und Flanken verkleinerten Ribozymen resultierte das Ribozym Rb8/12. Vor einer weiteren Modifizierung des Ribozyms wurde seine katalytische Aktivität bei veränderten Reaktionsbedingungen untersucht.

Wie die Katalysen anderer Enzymsysteme lassen sich ribozymkatalysierte Reaktionen durch Modulation von pH-Wert und Reaktionstemperatur beeinflussen. Des Weiteren wirken sich Konzentrationsänderungen von Metallionen, die sowohl viele Enzyme als auch Ribozyme als Cofaktoren für die optimale Katalyse benötigen, auf die Reaktion aus. Für den Reaktions-pH, die Temperatur und die Metallionenkonzentration existieren Optima, unter denen die Enzyme am effektivsten arbeiten. Diese liegen für die meisten Proteinenzyme im physiologischen Bereich. Bei extremeren Bedingungen, wie zu starker Hitze oder allzu niedriger bzw. zu hoher Wasserstoffionenkonzentration, können die Enzyme auf Grund der Denaturierung ihre Aktivität verlieren.

4.2.3.1 pH-Wert

Bereits Uhlenbeck (1987) untersuchte für seine katalytische RNA die Abhängigkeit der Spaltung eines Oligoribonukleotids von den Reaktionsbedingungen. Die dabei getroffenen Aussagen ließen sich in dieser Arbeit weitestgehend bestätigen. In der von Uhlenbeck dargestellten Abhängigkeit der Substrathalbwertszeit von dem pH-Wert wurde deutlich, dass der größte Effekt hinsichtlich des Umsatzes bei Änderungen des Reaktions-pHs im Bereich zwischen 6 und 8 zu erwarten ist. In diesem Sinne konnte auch in der vorliegenden Arbeit für das Ribozym Rb8/12 gezeigt werden, dass bei der Verminderung der Wasserstoffionenkonzentration von pH 7,5 auf 8,5 der k_{obs} -Wert um 200 % steigt, hingegen ein weitere Absenkung auf ein Zehntel nur noch einen Anstieg des k_{obs} -Werts um 10 % zur Folge hat. Insgesamt erhöhte sich damit bei einer Steigerung des pH von 6 auf 8 die Reak-

tionskonstante k_{obs} um den Faktor 3. Daraus lässt sich in Übereinstimmung mit Uhlenbeck schließen, dass der Reaktions-pH den reaktionslimitierenden Schritt nur indirekt beeinflusst, dass jedoch die stärkste Abhängigkeit im physiologischen pH-Bereich besteht.

4.2.3.2 Temperatur

Uhlenbeck (1989) untersuchte in weiteren Tests den Zusammenhang zwischen der Reaktionstemperatur und dem Reaktionsumsatz. Dabei erkannte er in der Arrhenius-Auftragung eine lineare Beziehung zwischen der Substrathalbwertszeit und der Reaktionstemperatur in einem Bereich von 10 °C bis 37 °C. Die zugehörige Aktivierungsenergie gab er mit $E = 13,1 \text{ kcal mol}^{-1}$ an. Für die Aktivität des Ribozyms Rb8/12 ist eine ähnliche Temperaturabhängigkeit anzunehmen. Die bei Temperaturen von 25 °C, 37 °C und 45 °C gemessenen k_{obs} -Werte lassen hier vermuten, dass das Temperatur-optimum oberhalb des physiologischen Bereichs liegt und es demzufolge für den praktischen Einsatz von Ribozymen in Zellen nur geringe Bedeutung hat.

4.2.3.3 Magnesiumkonzentration

Neben den Tests zum Reaktions-pH und der Reaktionstemperatur überprüfte Uhlenbeck in der Arbeit von 1989 den Einfluss verschiedene zweiwertige Metallionen auf den Reaktionsumsatz. Hierzu wurden getrennten Reaktionsansätzen Chlorsalze der Metalle Magnesium, Mangan, Kalzium und Zink zugegeben, so dass die Endkonzentration 10 mM betrug. Weitere Ansätze wurden mit Natriumchlorid, EDTA bzw. Spermidin in verschiedenen Konzentrationen versetzt. In diesen konnten jedoch keine Umsätze gemessen werden. Die höchste Effizienz zeigte die Katalyse bei der Zugabe von Manganchlorid. Sie unterschied sich von der Effizienz für den Ansatz mit Magnesiumchlorid um den Faktor 8 und für den Ansatz mit Kalziumchlorid um den Faktor 25. Bei Zugabe von Zinkchlorid erfolgte keine Substratspaltung. Eine detaillierte Untersuchung der Beziehung zwischen der Mg^{2+} -Konzentration und der Substrathalbwertszeit ergab eine Kurve mit zunächst starkem Abfall im Bereich zwischen 1 mM und 5 mM und einer folgenden asymptotischen Annäherung an einen Minimalwert bei Konzentrationen oberhalb von 20 mM. Danach schien die Aktivität des Ribozyms unabhängig von der Mg^{2+} -Konzentration zu sein.

Für das Ribozym Rb8/12 wurde der Einfluss der Mg^{2+} -Konzentration auf die Ribozymaktivität in einem ausgedehnteren Bereich untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass selbst bei Konzentrationen von bis zu 200 mM durchaus eine Abhängigkeit zwischen dem k_{obs} -Wert und dem Magnesiumgehalt besteht. Ebenfalls mit diesem Gegenstand beschäftigten sich Sawata et al. (1993). Dabei wurden von ihnen zwei mögliche Formen der Magnesiumabhängigkeit diskutiert. Zum einen für

reine RNA-Ribozyme die Abhängigkeit, bei der eine Sättigung erreicht wird, sobald die Mg^{2+} -Konzentration 100 mM überschreitet. Zum anderen für chimäre RNA-DNA-Ribozyme die Abhängigkeit, bei der der Reaktionsumsatz durch Zugabe von Magnesium auch noch im hochmolaren Bereich (1 M) zu steigern ist. Hendry und McCall (1995) hingegen vermuteten, dass für die meisten Ribozyme eine zweiphasige Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration besteht. So könnte eine zunächst exponentielle Abhängigkeit von einer linearen abgelöst werden.

In welcher Form die Aktivität des Ribozyms Rb8/12 von der Mg^{2+} -Konzentration abhängt, kann mit Hilfe der vorliegenden Daten nicht eindeutig bestimmt werden. Hierfür wären weitere Versuche notwendig, in denen die Mg^{2+} -Konzentration in einem größeren Bereich zu variieren wäre. Deutlich ist jedoch, dass innerhalb physiologischer Konzentrationen eine positive Korrelation besteht.

4.2.3.4 Facilitator

Neben der Modifizierung von pH-Wert, Reaktionstemperatur und Metallionenkonzentration kann die Aktivität eines Ribozyms auch durch die Zugabe von Oligonukleotiden beeinflusst werden. Goodchild stellte 1992 erste Untersuchungen zu diesen als Facilitatoren bezeichneten Strukturen an. Dabei erkannte er hinsichtlich ihrer Funktionsweise Ähnlichkeiten mit Coenzymen konventioneller Enzyme. Er fand heraus, dass Facilitatoren weder den chemischen Schritt der Substratspaltung beeinflussen noch die Produktdissoziation beschleunigen. Vielmehr erklärte Goodchild die Wirkung der Facilitatoren mit ihrem Einfluss auf die Bildung des Ribozym-Substrat-Komplexes. In diesem ersten Reaktionsschritt ist es den Facilitatoren möglich, die aus Ribozymflanken und Zielsequenz gebildete Helix zu stabilisieren. Unmittelbar dem 3'-Ende des Ribozyms benachbart lagern sie sich der Ziel-RNA auf Grund ihrer komplementären Sequenz an. Die erzeugte Stabilität ermöglicht es auch Ribozymen mit kurzen Flanken sich besser an das Substrat zu binden. Da kurze Flanken eine stärkere Produktdissoziation als längere bedingen, ist es verständlich, warum gerade bei kleinen Ribozymen der Einsatz eines Facilitators den Reaktionsumsatz verbessert. So zeigten Nesbitt et al. (1994), dass die Aktivität eines 5/5er Ribozyms durch die Zugabe einer 13 Basen umfassenden Facilitator-DNA um den Faktor 556 gesteigert werden konnte, der Facilitator hingegen bei einem 10/10er Ribozym keine Aktivitätssteigerung hervorrief.

Für die Wirkung des Facilitators sind neben den Ribozymflanken auch die Reaktionsbedingungen und die Struktur der Substrat-RNA entscheidend. Die erhebliche Aktivitätssteigerung für das 5/5er Ribozym nach Zugabe eines Facilitators waren von Nesbitt et al. (1994) bei der Spaltung einer 37 Basen langen Substrat-RNA unter multiple-turnover-Bedingungen (20facher Überschuss) gemessen worden. Für den Einsatz von Ribozymen in Zellen ist jedoch vor allem ihre Fähigkeit zur Spal-

tung längerer mRNA-Sequenzen von Bedeutung. In dieser Arbeit wurde eine Facilitator-DNA (13mer) bei der Spaltung eines langen Substrats unter single-turnover-Bedingungen eingesetzt. Wie bereits erwähnt, spielt die Bildung des Ribozym-Substrat-Komplexes unter Ribozymüberschuss für den Reaktionsumsatz nur eine geringe Rolle. Dies könnte die lediglich 60 %ige Steigerung der Aktivität des Ribozyms Rb8/12 bei Facilitator-Zugabe erklären. Es wurden jedoch für die Spaltung von größeren Substrat-mRNA auch stärkere Effekte der Facilitatoren nachgewiesen (Denman 1993, Nesbitt et al. 1994, Jankowsky und Schwenzer 1996 und 1998). Bei bis zu fünffachem Ribozymüberschuss und zum Teil geringen Magnesiumkonzentrationen (1mM) steigerte sich bei einigen Ribozymen die Aktivität um mehr als das Zehnfache. Jankowsky und Schwenzer benutzten dabei in ihren Arbeiten (1996 und 1998) DNA- und RNA-Facilitatoren. Diese wendeten sie sowohl als 5'- als auch 3'-Variante erfolgreich an. Zudem zeigten Jankowsky und Schwenzer (1998), dass auch unter zehnfachen multiple-turnover-Bedingungen, die in der Regel für den Umsatz langer Substrate ungeeignet schienen, die Aktivität der Ribozyme durch den Einsatz von Facilitatoren zu steigern ist. In künftigen Untersuchungen wäre zu klären, inwieweit Facilitatoren in der Lage sind, Ribozyme bei der Hemmung der Genexpression in Zellen zu unterstützen.

4.2.4 RNA-DNA-Ribozyme

Der nächste Schritt in der Entwicklung des metabolisch stabilen Ribozyms bestand in dem teilweisen Austausch der Ribonukleotide durch Desoxyribonukleotide. Dabei war es das Ziel, eine größtmögliche Menge an DNA in ein Hammerhead-Ribozym einzubringen, ohne dass es seine Aktivität verliert.

Für die Effekte, die durch die Substitution von RNA durch DNA hervorgerufen wurden, lassen sich in der Literatur zahlreiche Quellen finden, jedoch wurden in der Mehrzahl der kinetischen Untersuchungen kurze Substrate verwandt (Perreault et al. 1990, Yang et al. 1992, Hendry et al. 1992, Taylor et al. 1992, Shimayama et al. 1993, Hendry und McCall 1995). Diese Arbeit hingegen verglich RNA-DNA-Ribozyme (s.Abb. 31) bei der Spaltung einer langen Substrat-RNA. Dabei wurde untersucht, in welchem Maß sich der Basenwechsel in den verschiedenen Regionen der Ribozymstruktur auf die katalytische Aktivität auswirkt. Eine der Feststellungen, die die meisten Forschungsgruppen trafen, konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Sie besagt, dass ein Austausch von RNA durch DNA in den konservierten Regionen der Stammschleife mit erheblichen Aktivitätseinschränkungen der Ribozyme einhergeht. Demgemäß zeigten die Ribozyme Rb5/10V3 und Rb8/12V3a keine oder eine deutlich geringere Aktivität als die vergleichbaren Ribozyme Rb5/10V4 und Rb8/12V4.

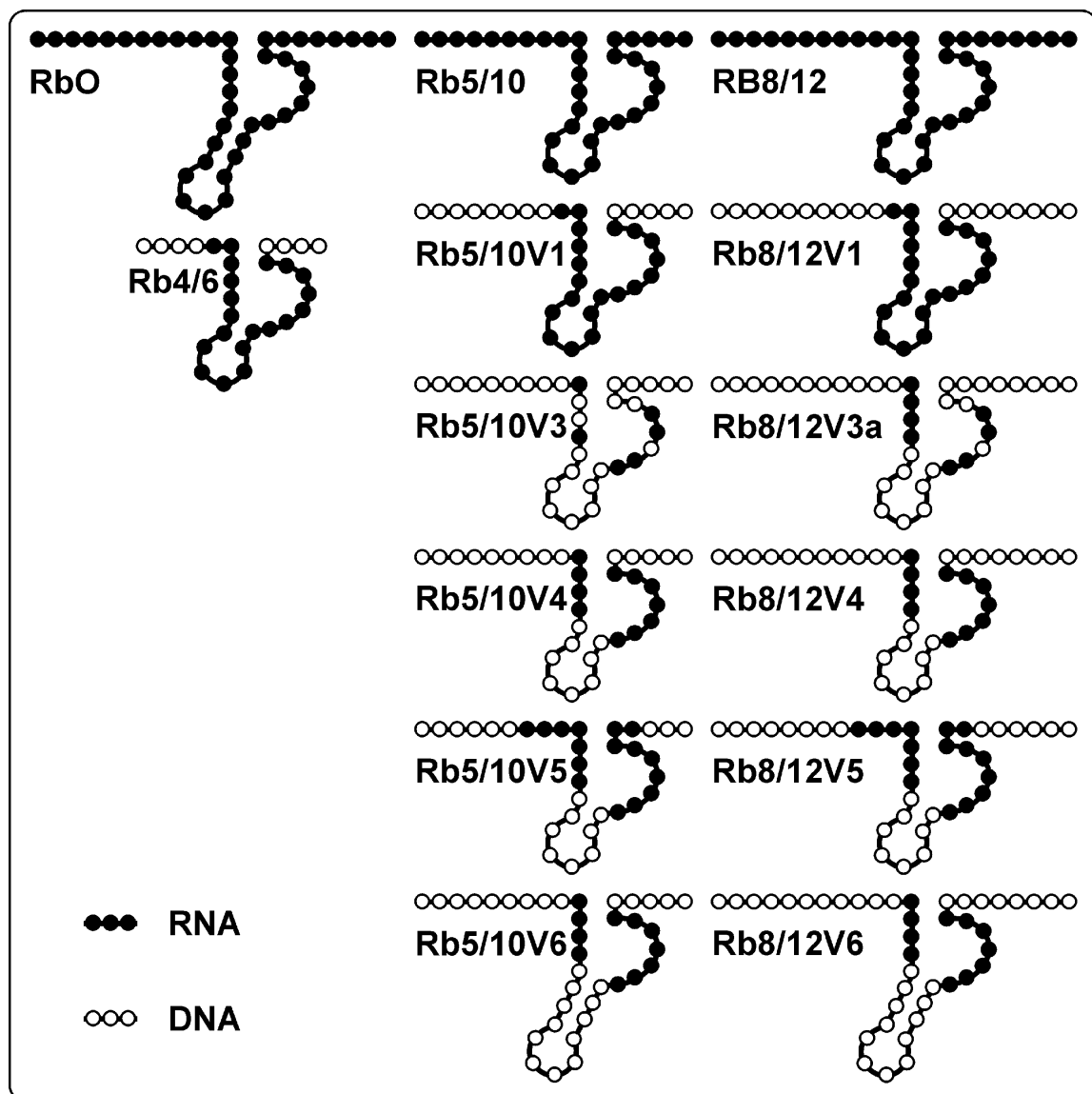


Abb. 31: Ribozymübersicht II.

Erste Untersuchungen zum Basenaustausch im konservierten Bereich der Stammschleife nahmen Perreault et al. (1990) vor. Sie wiesen die große Bedeutung der 2'-OH-Gruppen der konservierten Ribonukleotide für die Katalyse nach. Verschiedene Ribozyme, in deren Stammschleifen im unterschiedlichen Maß DNA eingebracht wurde, zeigten gegenüber dem Voll-RNA-Ribozym bis 200fach geringere k_{cat} -Werte. Unbeeinflusst von dem Austausch war die Substrataffinität. So besaßen alle Ribozyme annähernd gleiche K_m -Werte. Daher ist eine Funktion der Stammschleife bei der Bildung des Ribozym-Substrat-Komplexes nicht anzunehmen.

Für den Austausch von RNA durch DNA in den Ribozymflanken wurden in den Arbeiten von Hendry et al. (1992), Shimayama et al. (1993) und Hendry und McCall (1995) andere katalytische

Werte ermittelt. Entsprechend modifizierte Ribozyme zeigten gegenüber den Voll-RNA-Ribozymen überwiegend Steigerungen des k_{cat} -Werts (22fach bei Hendry et al. 1992). Starke Unterschiede hingegen wiesen die ermittelten K_m -Werte auf. Mit einer 65fachen Steigerung der Konstanten für das RNA-DNA-Ribozym gegenüber dem Voll-RNA-Ribozym wich der von Shimayama et al. (1993) erhaltene Wert deutlich von Hendrys ab. Hendry (1995) begründete diesen Unterschied mit der Zusammensetzung der von ihm benutzten Substrat-RNA TAT S13, die zu 67 % aus Purinbasen bestand. Shimayamas Substrat hingegen wies lediglich ein Gehalt von 30 % Purinen auf.

Vergleicht man die katalytischen Effizienzen (k_{cat}/K_m) für die chimären Ribozyme aus den Arbeiten von Hendry und Shimayama mit denen der Voll-RNA-Ribozyme, wird erkennbar, welchen Einfluss die Flankenlänge und der DNA-Gehalt der Flanken auf die Katalyse besitzen (s. Tabelle 9). So kann bei Ribozymen mit kurzen Flanken (von weniger als 6 Basen) der Austausch von RNA durch DNA zu einer verminderten katalytischen Effizienz führen.

Tabelle 9: Einfluss von Flankenlänge und DNA-Gehalt auf die kinetischen Parameter.

	Hendry (1992)^{a)}	Shimayama (1993)^{b)}	Hendry (1995)^{a)}	Hendry (1995)^{a)}
Ribozymflanken	10/10	5/5	10/10	6/6
$k_{\text{cat}} \text{ RD} / k_{\text{cat}} \text{ R}^{\text{c)}}$	22	3,6	5,1	0,83
$K_m \text{ RD} / K_m \text{ R}^{\text{c)}}$	1,6	65	1,2	2,8
$k_{\text{cat}}/K_m \text{ RD} / k_{\text{cat}}/K_m \text{ R}^{\text{c)}}$	14	0,05	4,3	0,29
$k_{\text{obs}} \text{ RD} / k_{\text{obs}} \text{ R}^{\text{d)}}$	-	-	19	< 0,99

Angegeben sind die Verhältnisse zwischen den katalytischen Konstanten der RNA-DNA-Ribozyme (RD) und der Voll-RNA-Ribozyme (R).

^{a)} Spaltung eines 13mer Substrats

^{b)} Spaltung eines 11mer Substrats

^{c)} unter multiple-turnover-Bedingungen

^{d)} unter single-turnover-Bedingungen

Wie die katalytische Effizienz scheint auch der k_{obs} -Wert von der Flankenlänge und dem DNA-Gehalt beeinflusst zu werden. Ein RNA-DNA-Basenaustausch führte unter single-turnover-Bedingungen bei dem Ribozym mit kurzen Flanken (TAT RB 6X2) zur Minderung und bei dem Ribozym mit langen Flanken (TAT RB) zu einer Erhöhung des k_{obs} -Werts (Hendry et al. 1995).

In der vorliegenden Arbeit erbrachte die Substratspaltung mit den allein in den Flanken DNA-modifizierten Ribozymen ein vergleichbares Ergebnis. Der Basenaustausch in den Flanken der Ribozyme R5/10 und Rb8/12 ergab die Ribozyme Rb5/10V1 bzw. Rb8/12V1. Für die beiden chimären Ribozyme wurden geringere k-Werte ermittelt als für die entsprechenden reinen RNA-

Ribozyme. Auffällig ist wiederum, dass die Minderung des k-Werts umso größer ist, je kleiner die Ribozymflanken sind. Das zusätzlich erstellte Ribozym Rb4/6V1, das sich gegenüber dem Ribozym Rb5/10V1 durch eine weitere Verkürzung der Flanken auszeichnet, zeigte keine Aktivität mehr.

Sowohl in den Flanken als auch im Bereich der nichtkonservierten Region der Stammschleife wurden die Varianten V4, V5 und V6 der Ribozyme Rb5/10 und Rb8/12 mit DNA modifiziert. Dabei scheint die DNA-Modifikation der Stammschleife keinen negativen Einfluss auf die Ribozymaktivität auszuüben. Wie bei Shimayama et al. (1993) führte der zusätzliche Basenaustausch in diesem Bereich eher zu einer leichten Erhöhung der Ribozymaktivität (vergleiche Ribozymvarianten V4 mit V1).

Gegenüber den reinen RNA-Ribozymen RbO und Rb8/12 weisen die in Flanken und Stammschleife DNA-modifizierten Ribozyme Rb8/12V6 und Rb8/12V4 nahezu identische k-Werte auf. Nomenklatorisch ist zu bemerken, dass die V6-Varianten keine echten Abkömmlinge der Ribozyme Rb5/10 und Rb8/12 sind, da sie keine verkürzte Stammschleife besitzen.

Aus den Untersuchungen zur DNA-Modifikation der Hammerhead-Ribozyme resultiert das Ribozym Rb8/12V4, das bei hoher Aktivität zum überwiegenden Teil (71 %) aus DNA besteht. Der hohe Anteil an Desoxyribonukleinsäure im Ribozym hat mehrere Vorteile. Erstens kann die Aktivität eines Hammerhead-Ribozyms mit langen Flanken durch DNA-Modifikationen im Bereich der Flanken und der nichtkonservierten Region der Stammschleife gesteigert werden. Zweitens erhöht sich bei diesen Ribozymen die Widerstandsfähigkeit gegenüber Ribonukleasen, insbesondere gegenüber 3'-Exonukleasen (Hendry et al. 1992). Und drittens lassen sich durch den DNA-Einbau die Synthesekosten der Ribozyme erheblich senken.

4.2.5 Modifizierung mit Phosphorothioaten

Aus den Untersuchungen zum RNA-DNA-Basenaustausch ging mit Rb8/12V4 ein DNA-reiches und zugleich aktives Ribozym hervor. Um die Stabilität des Ribozyms zu erhöhen, wurden im nächsten Schritt Phosphorothioat-Modifikationen vorgenommen. In früheren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die Einführung von Phosphorothioaten in Oligonukleotide zur Steigerung ihrer Nukleasenstabilität beitragen kann (Eckstein 1985, Goodchild 1990). Allerdings führte die Einbindung von Phosphorothioaten (PT) in konservierte Regionen der Ribozyme zu einer Verminderung der katalytischen Aktivität (Buzayan et al. 1990, Ruffner und Uhlenbeck 1990).

Eine Modifizierung der Ribozymflankenenden leitete diesen Abschnitt der Untersuchungen ein. Dazu wurde ausgehend von Rb8/12V4 das Ribozym Rb8/12V4PT erstellt. Dieses unterschied sich von dem Ausgangsribozym durch eine PT-Modifikation am 5'- und drei PT-Modifikationen am

3'-Ende. Im Vergleich der beiden Ribozyme ergab sich für das PT-modifizierte eine Verringerung des k_{obs} -Werts um 30 %. Eine Minderung der katalytischen Effizienz um denselben Betrag wurde von Heidenreich und Eckstein (1992) für ein Ribozym ermittelt, nachdem es in gleicher Weise modifiziert worden war. Eine erhöhte Nukleasenstabilität konnte jedoch für dieses reine RNA-Ribozym nicht festgestellt werden. Erst der Austausch der Pyrimidinbasen durch die entsprechenden Desoxyribonukleoside führte zu einer gesteigerten Widerstandskraft. Auch Shimayama et al. (1993) konnten für ein nur in den Flanken und im nichtkonservierten Teil der Stammschleife PT- und DNA-modifiziertes Hammerhead-Ribozym keine deutlich höhere Nukleasenstabilität als für das Voll-RNA-Ribozym ermitteln. Hingegen steigerte die Einführung von drei PT-Modifikationen in den konservierten Sequenzbereichen des Ribozyms die Stabilität merklich. Die höchste Stabilität jedoch erreichten Shimayama et al. mit zwei Ribozymen, die zwar nur zwei Phosphorothioatverbindungen in der konservierten Region aufwiesen, bei denen aber dafür ein Uracil gegen ein Adenin bzw. Guanin ausgetauscht wurde. Von beiden Ribozymen stellte sich das Adenin-Ribozym als das aktivere heraus. Seine katalytische Effizienz jedoch war 15 mal geringer als die des Voll-RNA-Ribozyms. Basierend auf den Ergebnissen von Shimayama et al. wurde in dieser Arbeit das Ribozym Rb8/12V4PT weiter modifiziert, wodurch das Ribozym RbS entstand. In der folgenden Abbildung wird illustriert, welche Modifikationen diese Ribozym gegenüber dem Ausgangsribozym RbO aufweist.

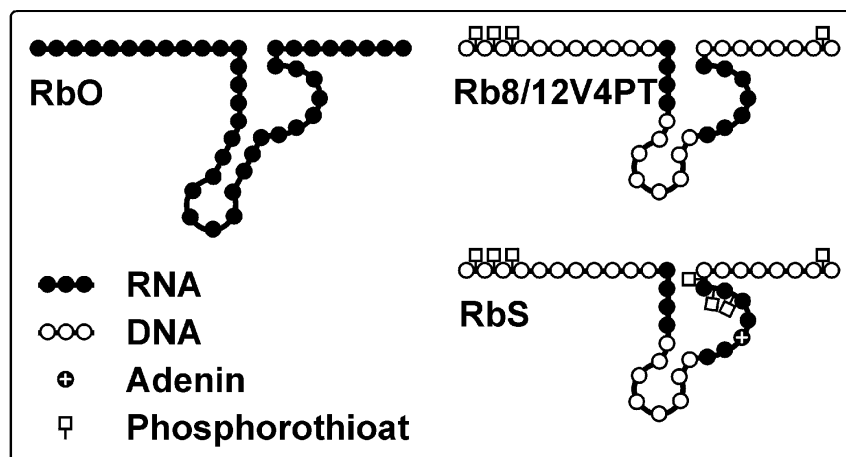


Abb. 32: Ribozymübersicht III.

Im Unterschied zu den Ergebnissen von Shimayama et al. (1993) wies das Ribozym RbS trotz aller Modifikationen die gleiche Aktivität wie das reine RNA-Ribozym RbO auf. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die Aktivitäten der Ribozyme nur bedingt miteinander verglichen werden

können, da im Unterschied zum RbS-Ribozym in Shimayamas stabilisierten Ribozymen sämtliche Desoxyribonukleotide PT-modifiziert sind.

Abschließend wurde geprüft, welchen Einfluss ein kationisches Lipid *in vitro* auf die Substratspaltung hat. Für eine Hemmung der Ribozymaktivität durch die Lipide, die zur Transfektion benötigt werden, wären mehrere Ursachen denkbar. So könnte zum Beispiel die Sekundärstruktur des Ribozyms oder des Substrats durch die geladenen Lipide verändert werden. Des Weiteren wäre bedingt durch die Bildung von Lipid-Ribozym- bzw. Lipid-Substrat-Komplexen die räumliche Trennung von Ribozymen und Substrat möglich. Eine starke Verringerung oder gar die Aufhebung der Ribozymaktivität konnte jedoch nach Zugabe des Lipids nicht nachgewiesen werden (Abb. 20).

4.3 Stabilitätstest

Im Stabilitätstest wurde die Widerstandsfähigkeit für die Ribozyme RbO und RbS gegenüber Nukleasen untersucht. Dabei erwies sich das Ribozym RbS mit einer mindestens 10fach höheren Halbwertszeit in einer 1 %igen FCS-Lösung als das deutlich stabilere Ribozym. Shimayama et al. (1993) testeten die Stabilität ihrer Ribozyme sowohl in 0,1 %iger FCS-Lösung als auch in 20 %igem Humanserum. In dem vergleichsweise gering konzentrierten Kälberserum konnten für das Adenin- bzw. das Guanin-Ribozym höhere Halbwertszeiten als für das RbS-Ribozym ermittelt werden.

Eine deutlich höhere Aggressivität des Kälberserums gegenüber den Ribozymen ergab der Vergleich der Seren in Shimayamas Arbeit. Der Umstand, dass Modifizierungen in den verschiedenen Bereichen der Ribozymstruktur eine ungleiche Zunahme der Stabilität in den Seren bedingten, lässt Abweichungen in der Nukleasenzusammensetzung der Seren vermuten. So ist für das Humanserum ein höherer Gehalt an Exoribonukleasen anzunehmen, da hier die Stabilität eines Ribozyms nach einer DNA-Modifizierung der Flanken merklich zunahm. Im Kälberserum hingegen scheinen die Endoribonukleasen die Aggressivität gegenüber den Ribozymen zu bedingen. In diesem Fall steigerte die PT-Modifizierung der Basen im katalytischen Teil der Stammschleife und der Pyrimidinbasenaustausch die Ribozymstabilität.

Weitaus größere Steigerungen der Stabilität der Ribozyme lassen sich dadurch erreichen, dass in der 2'-Position chemisch modifizierte Ribonukleotide eingebaut werden. Für entsprechende Ribozyme mit C-Allyl- bzw. O-Methyl-modifizierten Nukleotiden konnten Halbwertszeiten nachgewiesen werden, die das 50.000fache der des reinen RNA-Ribozyms überschritten (Beigelman et al. 1995). Jedoch stehen der großen Stabilität hohe Synthesekosten gegenüber.

4.4 Transfektion

Für den Einsatz von Ribozymen als Expressionshemmer ist es notwendig, sie an ihren Wirkungsort, das Zytoplasma, zu transportieren. Hierfür existieren grundsätzlich zwei Wege. Zum einen ist es möglich, die Ribozymsequenz in DNA zu kodieren. In ein Plasmid eingebunden wird diese in die Zellen transfiziert, so dass die Zellen selbst die Ribozyme direkt an ihrem Wirkungsort herstellen. Um jedoch die Ribozymwirkung nachzuweisen, ist es erforderlich, die Zellen stabil zu transfizieren. Mehreren Arbeitsgruppen gelang es, mit Hilfe dieser Methode die Expression bestimmter Gene zu hemmen (Cotten und Birnstiel 1989, Scanlon et al. 1991, L'Huillier et al. 1992, Cantor et al. 1993, Potter et al. 1993, Denman et al. 1994, Kobayashi et al. 1994).

Zum anderen können vorgefertigte Ribozyme direkt in die Zellen eingebracht werden. Für den Transfer von Nukleinsäuren in Zellen steht neben Elektroporation, Mikroinjektion und weiteren Methoden die Transfektion mittels kationischer Lipide zur Verfügung (Überblick von Cotten 1990). In einigen Arbeiten wurde bereits die Wirkung transfizierter Ribozyme untersucht (Sioud et al. 1992, Snyder et al. 1993). Dabei ließ sich für bestimmte Gene die Unterdrückung ihrer Expression nachweisen.

Untersuchungen zur lipidvermittelten Transfizierung von Zellen mit Nukleinsäuren ergaben, dass verschiedene Zelllinien hinsichtlich der Transfektionsparameter, wie das Massenverhältnis von Lipid und Nukleinsäure, unterschiedliche Optima besitzen (Felgner et al. 1987, Malone et al. 1989). Um diesen Umstand zu berücksichtigen und um ein optimales Transfektionsergebnis zu erzielen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Zellen des Nierenzellkarzinoms RCC 95/96 mit acht verschiedenen Lipid-Lösungen des PerFect Lipid Transfection Kits (Invitrogen) transfiziert. Dabei wurden für das Lipid 6 und 8 unterschiedliche Lipid-Ribozym-Massenverhältnisse getestet. Für eine optimale Wirkung der Ribozyme sollten diese mittels der Transfektion eine möglichst diffuse zytoplasmatische Verteilung in den Zellen erreichen. Das beste Transfektionsresultat konnte mit dem Lipid 6 in einem Massenverhältnis von 6 zu 1 gegenüber dem fluoresceinmarkierten Ribozym RbF erzielt werden. Im konfokalen Lasermikroskop war in diesem Fall neben dem punktförmigen Leuchten liposomaler Einschlüsse die diffuse Färbung des Zytoplasmas am ausgeprägtesten. Die katalytische Aktivität des Ribozyms RbF spielte in dem Transfektionsversuch keine Rolle. In den kinetischen Untersuchungen wurde jedoch deutlich, dass die Fluorescein-Markierung die Aktivität des Ribozyms einschränkte. Es zeigte gegenüber dem nichtmarkierten - ansonsten identischen - Ribozym Rb8/12V4PT einen über 75 % geringeren k_{obs} -Wert.

4.5 Behandlung der Zellen

Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die In-vivo-Wirksamkeit des entwickelten Ribozyms RbS getestet. Dabei zeigte das Ribozym gegenüber den Kontrollen, einem Antisense-Oligonukleotid und einem Ribozym mit zur PTHrP-mRNA inkomplementären Flanken, keine signifikante Wirkung. Darüber hinaus konnte im Vergleich zur Kontrollsekretion nach der Transfizierung der Zellen mit dem Ribozym keine geringere PTHrP-Konzentration im Zellüberstand gemessen werden. Wird die vergleichsweise starke Aktivität des Ribozyms RbS im zellfreien System betrachtet, lassen sich für die ausbleibende Wirkung in vivo verschiedene Gründe annehmen.

Beispielsweise besteht die Möglichkeit, dass die Zielsequenz innerhalb der PTHrP-mRNA auf Grund von Sekundärstrukturen für das Ribozym nicht erreichbar ist. Dabei könnten Abweichungen in der Sekundärstruktur der PTHrP-mRNA zwischen dem zellfreien System und den zellulären Bedingungen durch den Längenunterschied der Sequenzen bedingt sein. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Tests mit einem Antisense-Oligonukleotid, das der Flankensequenz entspricht. Dieses hybridisiert an die gleiche Zielsequenz wie das Ribozym. Jedoch auch bei der Behandlung der Zellen mit dem ASO in Konzentrationen bis 10 μM war keine Wirkung nachzuweisen. Im Gegensatz dazu verursachte - in den Untersuchungen von Bunge (1997) - die Behandlung der selben Zelllinie mit einem Antisense-Oligonukleotid in einer Konzentration von 2,5 μM eine deutliche Hemmung der Translation. Diese Diskrepanz lässt sich am ehesten auf die unterschiedlichen Zielsequenzen der verwendeten Antisense-Oligonukleotide zurückführen:

	Zielsequenz kodiert für Aminosäuren
ASO in der vorliegenden Arbeit	10 - 16
ASO von Bunge (1997)	4 - 9

Des Weiteren besaß das Ribozym mit 166 nM und 1 μM im Transfektionsmedium eine vergleichsweise niedrige Konzentration. In anderen Arbeiten wurden für die Transfektion von Zellen mit zwischen 4 μM und 50 μM weitaus höhere Ribozymkonzentrationen genutzt (Sioud et al. 1992, Snyder et al. 1993). In dieser Arbeit konnte jedoch aus technischen Gründen die Ribozymkonzentration nur begrenzt angehoben werden. Ebenfalls erscheint die 60minütige Behandlungszeit der Zellen gegenüber den Zeiten in anderen Arbeiten kurz (Sioud et al. 1992, Snyder et al. 1993). Hier wurden die Zellen über Zeiträume von 20 bis 72 Stunden behandelt. Eine lange Behandlungsdauer mit einer hohen Transfektionseffizienz kann aber noch keine Ribozymwirkung garantieren, solange das Ribozym

zym nicht frei im Zytoplasma vorliegt. In den Transfektionsversuchen mit dem fluoresceinmarkierten Ribozym konnte nachgewiesen werden, dass auch bei einer Behandlungszeit von nur einer Stunde und der verwendeten Ribozymkonzentration eine gute zelluläre Aufnahme und eine zytoplasmatische Verteilung des Ribozym erfolgte.

Zweifelsohne wird die Wirkung von expressionshemmenden Mitteln, wie Ribozymen und Antisense-Oligonukleotiden, auch von der Stärke der Genexpression beeinflusst. Sie bestimmt im Zusammenhang mit der absoluten Ribozymmenge in der Zelle die Ribozym-Substrat-Relation. So ist die Wirkung von Expressionshemmern in solchen Zellen geringer, die das entsprechende Gen stark regulieren und daher eine große Menge an mRNA herstellen.

Letztendlich ist zu diskutieren, ob das Ribozym RbS über eine ausreichende Stabilität für einen Einsatz *in vivo* verfügte. Eine direkte Kontrolle der Ribozymstabilität in der Zelle gestaltet sich schwierig. So können lediglich Stabilitätstests mit Zellüberständen oder lysierten Zellen einen Hinweis auf die Widerstandskraft gegenüber Nukleasen geben. In Anbetracht dessen, dass selbst ein „nur“ DNA-modifiziertes Ribozym (Snyder et al. 1993) stabil genug war, um in transfizierten Zellen zu wirken, macht eine ausreichend hohe Stabilität des Ribozyms RbS wahrscheinlich.

4.6 Aussagen

Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Hammerhead-Ribozym RbS konnte in den Zellen des Nierenzellkarzinoms RCC 95/96 trotz hoher Aktivität *in vitro* und gesteigerter metabolischer Stabilität keine nachweisbare Wirkung hervorrufen. Aus den hier vorliegenden Ergebnissen und Literaturangaben lassen sich zusammenfassend für die Entwicklung von metabolisch stabilen Ribozymen zur direkten Behandlung von Zellen in Monolayer-Zellkultur folgende Aussagen treffen:

- Die Aktivität eines Hammerhead-Ribozyms kann durch Optimierung der Flankenlänge und durch Baseneinsparungen in der Stammschleife erhöht werden. Dabei sind, um eine spätere Aktivität in den Zellen zu gewährleisten, in den zellfreien Versuchen möglichst große Ziel-RNA zu spalten.
- Der Austausch von Ribonukleotide durch Desoxyribonukleotide ist innerhalb der Ribozymstruktur umfangreich möglich. Neben der gesteigerten Widerstandskraft gegenüber Ribonukleasen und geringeren Synthesekosten kann er eine erhöhte Ribozymaktivität bedingen.
- In fast allen Bereichen des Ribozyms können eingeführte Phosphorothioatverbindungen die Ribozymstabilität vergrößern. Bei der Modifizierung der konservierten Region der Stammschlei-

fe ist jedoch mit einer Verminderung der katalytischen Aktivität zu rechnen. Hier kann der Austausch genau festgelegter Pyrimidinbasen gegen Purinbasen eine höhere Stabilität bei erhaltener Aktivität bewirken.

- Die Fluorescein-Markierung des Ribozym ermöglicht eine direkte Transfektionskontrolle unter dem Mikroskop. Im Idealfall ist nach erfolgter Transfektion eine diffuse zytoplasmatische Verteilung des Ribozyms in der Zelle zu erkennen. Eine Optimierung der Transfektion ist nur durch Testreihen mit verschiedenen Lipiden und mit unterschiedlichen Lipid-Ribozym-Massenverhältnissen zu erreichen.

5 Zusammenfassung

Mit der Entdeckung der katalytischen Aktivität von Ribonukleinsäuren wurde begonnen, darauf basierende therapeutische Strategien zu entwickeln, die auf genetischer Ebene den Stoffwechsel oder virale Infektionen von Zellen beeinflussen. Entsprechende Oligoribonukleotide waren befähigt, spezifisch RNA-Stränge zu erkennen und zu spalten. In Analogie zu Enzymen wurden sie als Ribozyme bezeichnet.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines metabolisch stabilen Hammerhead-Ribozyms. Dieses sollte lipidvermittelt in die Zellen des Nierenzellkarzinoms RCC 95/96 transfiziert werden und dort die Genexpression des dem Parathormon verwandten Proteins (PTHrP) durch die Spaltung der PTHrP-mRNA unterdrücken. Ausgangspunkt der Entwicklung war das Hammerhead-Ribozym RbO. Es wies in zellfreien Versuchen bei der Spaltung einer 232 Basen langen Substrat-RNA mit einem k_{obs} -Wert von $47,42 \text{ min}^{-1} (\times 10^{-3})$ eine zur Literatur vergleichbar hohe Aktivität auf, jedoch zeigte es sich als reiner RNA-Strang gegenüber Nukleasen sehr fragil. Das Endprodukt der in mehreren Schritten abgelaufenen Weiterentwicklung des Ribozyms RbO stellte das Ribozym RbS dar. Im Vergleich zum Ausgangsribozym bestand das in der Stammschleife verkürzte Ribozym zu 71 % aus DNA. Es besaß Phosphorothioatmodifikationen in den Flanken und in den konservierten Sequenzbereichen. Zudem war durch einen Basenwechsel im katalytischen Teil der Stammschleife eine Pyrimidinbase durch eine Purinbase ausgetauscht worden. Zusammen bedingten die genannten Veränderungen eine Steigerung der Ribozymstabilität um mehr als das Zehnfache. Dabei war die katalytische Aktivität des Ribozyms RbS mit einem k_{obs} -Wert von $45,76 \text{ min}^{-1} (\times 10^{-3})$ gegenüber RbO annähernd identisch.

Das schrittweise Vorgehen bei der Ribozymentwicklung mit dem Erstellen von 20 unterschiedlich modifizierten Ribozymen ermöglichte es, den Einfluss einzelner Modifikationen auf die Ribozymaktivität zu prüfen. Mehrfach konnten dabei die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen bestätigt werden. So wurde erkannt, dass für viele Modifikationen, wie Ribozymverkleinerung, RNA-DNA-Basenaustausch und Phosphorothioateinbindung, die Auswirkung auf die katalytische Aktivität nur begrenzt vorherzusagen ist und optimale Ergebnisse nur durch Testreihen zu erlangen sind.

Bei der Behandlung der Tumorzellen in Monolayer-Zellkultur ließ sich für das Ribozym RbS keine signifikante Wirkung nachweisen. Als Ursache dafür ist am ehesten die auf Grund von Sekundärstrukturen fehlende Erkennung der Zielsequenz innerhalb der PTHrP-mRNA anzunehmen.

Literaturverzeichnis

- Abou Samra, A. B., Jüppner, H., Force, T., Freeman, M. W., Kong, X. F., Schipani, E., Urena, P., Richards, J., Bonventre, J. V., Potts, J. T., Jr. et al. (1992):
Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 2732-2736
- Albright, F. (1941):
Case records of the Massachusetts General Hospital (case 27461).
N. Engl. J. Med. 225, 789-791
- Beigelman, L., McSwiggen, J. A., Draper, K. G., Gonzalez, C., Jensen, K., Karpeisky, A. M., Modak, S., Matulic-Adamic, J., DiRenzo, A. B., Haeberli, P. (1995):
Chemical modification of hammerhead ribozymes. Catalytic activity and nuclease resistance.
J. Biol. Chem. 270, 25702-25708
- Beigelman, L., Karpeisky, A., Matulic-Adamic, J., Haeberli, P., Sweedler, D., Usman, N. (1995):
Synthesis of 2'-modified nucleotides and their incorporation into hammerhead ribozymes.
Nucleic Acids Res. 23, 4434-4442
- Brandt, D. W., Wachsman, W., Deftos, L. J., (1994):
Parathyroid hormone-like protein: alternative messenger RNA splicing pathways in human cancer cell lines.
Cancer Res. 54, 850-853
- Broadus, A. E., Mangin, M., Ikeda, K., Insogna, K. L., Weir, E. C., Burtis, W. J., Stewart, A. F. (1988):
Humoral hypercalcemia of cancer. Identification of a novel parathyroid hormone-like peptide.
N. Engl. J. Med. 319, 556-563
- Bunge, A. (1997):
Autokrine Effekte von Parathormon-verwandtem Protein (PTHrP) auf invasionsassoziierte Proteasen in Tumorzelllinien.
Diss., Berlin, Humboldt-Universität
- Burtis, W. J., Wu, T., Bunch, C., Wysolmerski, J. J., Insogna, K. L., Weir, E. C., Broadus, A. E., Stewart, A. F. (1987):

- Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy.
J. Biol. Chem. 262, 7151-7156
- Burton, P. B., Moniz, C. and Knight, D. E. (1990):
Parathyroid hormone related peptide can function as an autocrine growth factor in human renal cell carcinoma.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 167, 1134-1138
- Buzayan, J. M., van Tol, H., Feldstein, P. A., Bruening, G. (1990):
Identification of a non-junction phosphodiester that influences an autolytic processing reaction of RNA.
Nucleic Acids Res. 18, 4447-4451
- Cantor, G. H., McElwain, T. F., Birkebak, T. A., Palmer, G. H. (1993):
Ribozyme cleaves rex/tax mRNA and inhibits bovine leukemia virus expression.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10932-10936
- Cech, T. R. (1986):
RNA as an enzyme.
Sci. Am. 255, 64-75
- Cotten, M., Birnstiel, M. L. (1989):
Ribozyme mediated destruction of RNA in vivo.
EMBO J. 8, 3861-3866
- Cotten, M. (1990):
The in vivo application of ribozymes.
Trends Biotechnol. 8, 174-178
- Denman, R. B., Smedman, M., Ju, W., Rubenstein, R., Potempska, A., Miller, D. L. (1994):
Ribozyme mediated degradation of beta-amyloid peptide precursor mRNA in COS-7 cells.
Nucleic Acids Res. 22, 2375-2382
- Denman, R. B. (1993):
Cleavage of full-length beta APP mRNA by hammerhead ribozymes.
Nucleic Acids Res. 21, 4119-4125
- Eckstein, F. (1985):
Nucleoside phosphorothioates.
Annu. Rev. Biochem. 54, 367-402

- Fedor, M. J., Uhlenbeck, O. C. (1990):
 Substrate sequence effects on "hammerhead" RNA catalytic efficiency.
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1668-1672
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., Danielsen, M. (1987):
 Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417
- Forster, A. C., Symons, R. H. (1987):
 Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites.
 Cell 49, 211-220
- Goodchild, J. (1992):
 Enhancement of ribozyme catalytic activity by a contiguous oligodeoxynucleotide (facilitator) and by 2'-O-methylation.
 Nucleic Acids Res. 20, 4607-4612
- Goodchild, J. (1990):
 Conjugates of oligonucleotides and modified oligonucleotides: a review of their synthesis and properties.
 Bioconjug. Chem. 1, 165-187
- Guo, J., Iida-Klein, A., Huang, X., Abou-Samra, A. B., Segre, G. V., Bringhurst, F. R. (1995):
 Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor density modulates activation of phospholipase C and phosphate transport by PTH in LLC-PK1 cells.
 Endocrinology 136, 3884-3891
- Hampel, A., Tritz, R. (1989):
 RNA catalytic Properties of the minimum (-) sTRSV sequence.
 Biochemistry 28, 4929-4933
- Haseloff, J., Gerlach, W. L. (1988):
 Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities.
 Nature 334, 585-591
- Heidenreich, O., Eckstein, F. (1992):
 Hammerhead ribozyme-mediated cleavage of the long terminal repeat RNA of human immunodeficiency virus type 1.
 J. Biol. Chem. 267, 1904-1909

- Helene, C., Toulme, J. J. (1990):
Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids.
Biochim. Biophys. Acta. 1049, 99-125
- Hendry, P., McCall, M. J., Santiago, F. S., Jennings, P. A. (1992):
A ribozyme with DNA in the hybridising arms displays enhanced cleavage ability.
Nucleic Acids Res. 20, 5737-5741
- Hendry, P., McCall, M. J., Santiago, F. S., Jennings, P. A. (1995a):
In vitro activity of minimised hammerhead ribozymes.
Nucleic Acids Res. 23, 3922-3927
- Hendry, P., McCall, M. J. (1995b):
A comparison of the in vitro activity of DNA-armed and all-RNA hammerhead ribozymes.
Nucleic Acids Res. 23, 3928-3936
- Hendry, P., McCall, M. (1996):
Unexpected anisotropy in substrate cleavage rates by asymmetric hammerhead ribozymes.
Nucleic Acids Res. 24, 2679-2684
- Ikeda, K., Mangin, M., Dreyer, B. E., Webb, A. C., Posillico, J. T., Stewart, A. F., Bander, N. H.,
Weir, E. C., Insogna, K. L., Broadus, A. E. (1988):
Identification of transcripts encoding a parathyroid hormone-like peptide in messenger
RNAs from a variety of human and animal tumors associated with humoral hypercalcemia of
malignancy.
J. Clin. Invest. 81, 2010-2014
- Jankowsky, E., Schwenzler, B. (1996):
Efficient improvement of hammerhead ribozyme mediated cleavage of long substrates by
oligonucleotide facilitators.
Biochemistry 35, 15313-15321
- Jankowsky, E., Schwenzler, B. (1998):
Oligonucleotide facilitators enable a hammerhead ribozyme to cleave long RNA substrates
with multiple-turnover activity.
Eur. J. Biochem. 254, 129-134
- Kobayashi, H., Dorai, T., Holland, J. F., Ohnuma, T. (1994):
Reversal of drug sensitivity in multidrug-resistant tumor cells by an MDR1 (PGY1) ribozyme.
Cancer Res. 54, 1271-1275

- Kovacs, C. S., Chik, C. L., Li, B., Karpinski, E., Ho, A. K. (1995):
Inhibition of serine/threonine protein phosphatases enhances agonist-stimulated cAMP accumulation in UMR 106 osteoblast-like cells.
Mol. Cell Endocrinol. 110, 9-16
- Lange, W., Daskalakis, M., Finke, J., Dolken, G. (1994):
Comparison of different ribozymes for efficient and specific cleavage of BCR/ABL related mRNAs.
FEBS Lett. 338, 175-178
- L'Huillier, P. J., Davis, S. R., Bellamy, A. R. (1992):
Cytoplasmic delivery of ribozymes leads to efficient reduction in alpha-lactalbumin mRNA levels in C127I mouse cells.
EMBO J. 11, 4411-4418
- Malone, R. W., Felgner, P. L., Verma, I. M. (1989):
Cationic liposome-mediated RNA transfection.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6077-6081
- Mangin, M., Ikeda, K., Dreyer, B. E., Broadus, A. E. (1989):
Isolation and characterization of the human parathyroid hormone-like peptide gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2408-2412
- Martin, T. J., Allan, E. H., Caple, I. W., Care, A. D., Danks, J. A., Diefenbach-Jagger, H., Ebeling, P. R., Gillespie, M. T., Hammonds, G., Heath, J. A., Hudson, P. J., Kemp, B. E., Kubota, M., Kukreja, S. C., Moseley, J. M., Ng, K. W., Raisz, L. G., Rodda, C. P., Simmons, H. A., Suva, L. J., Wettenhall, R. E. H., Wood, W. I. (1989):
Parathyroid hormone-related protein: isolation, molecular cloning, and mechanism of action.
Recent. Prog. Horm. Res. 45, 467-506
- McCall, M. J., Hendry, P., Jennings, P. A. (1992):
Minimal sequence requirements for ribozyme activity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 5710-5714
- McConnell, T. S. (1997):
Theoretical considerations in measuring reaction parameters.
Methods Mol. Biol. 74, 187-198
- Moseley, J. M., Kubota, M., Diefenbach-Jagger, H., Wettenhall, R. E. H., Kemp, B. E., Suva, L. J., Rodda, C. P., Ebeling, P. R., Hudson, P. J., Zajac, J. D., Martin, T. J. (1987):
Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line.

- Nakamura, M., Hashimoto, T., Furuyama, J., Kakudo, K. (1995):
Multiple alternative splice isoforms of parathyroid hormone-related peptide mRNA in human cell lines.
J. Mol. Endocrinol. 15, 245-249
- Nesbitt, S., Goodchild, J. (1994):
Further studies on the use of oligonucleotide facilitators to increase ribozyme turnover.
Antisense Res. Dev. 4, 243-249
- Paolella, G., Sproat, B. S., Lamond, A. I. (1992):
Nuclease resistant ribozymes with high catalytic activity.
EMBO J. 11, 1913-1919
- Perreault, J. P., Wu, T. F., Cousineau, B., Ogilvie, K. K., Cedergren, R. (1990):
Mixed deoxyribo- and ribo-oligonucleotides with catalytic activity.
Nature 344, 565-567
- Perriman, R., Delves, A., Gerlach, W. L. (1992):
Extended target-site specificity for a hammerhead ribozyme.
Gene 113, 157-163
- Pieken, W. A., Olsen, D. B., Benseler, F., Aurup, H., Eckstein, F. (1991):
Kinetic characterization of ribonuclease-resistant 2'-modified hammerhead ribozymes.
Science 253, 314-317
- Potter, P. M., Harris, L. C., Remack, J. S., Edwards, C. C., Brent, T. P. (1993):
Ribozyme-mediated modulation of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression.
Cancer Res. 53, 1731-1734
- Ruffner, D. E., Uhlenbeck, O. C. (1990):
Thiophosphate interference experiments locate phosphates important for the hammerhead RNA self-cleavage reaction.
Nucleic Acids Res. 18, 6025-6029
- Sawata, S., Shimayama, T., Komiyama, M., Kumar, P. K., Nishikawa, S., Taira, K. (1993):
Enhancement of the cleavage rates of DNA-armed hammerhead ribozymes by various divalent metal ions.
Nucleic Acids Res. 21, 5656-5660

- Scanlon, K. J., Jiao, L., Funato, T., Wang, W., Tone, T., Rossi, J. J., Kashani-Sabet, M. (1991):
Ribozyme-mediated cleavage of c-fos mRNA reduces gene expression of DNA synthesis enzymes and metallothionein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10591-10595
- Sharmeen, L., Kuo, M. Y. P., Dinter-Gottlieb, G., and Taylor, J. (1988):
Antigenomic RNA of human hepatitis delta virus can undergo self-cleavage.
J. Virol. 62, 2674-2679
- Shimayama, T., Nishikawa, F., Nishikawa, S., Taira, K. (1993):
Nuclease-resistant chimeric ribozymes containing deoxyribonucleotides and phosphorothioate linkages.
Nucleic Acids Res. 21, 2605-2611
- Sioud, M., Natvig, J. B., Forre, O. (1992):
Preformed ribozyme destroys tumour necrosis factor mRNA in human cells.
J. Mol. Biol. 223, 831-835
- Snyder, D. S., Wu, Y., Wang, J. L., Rossi, J. J., Swiderski, P., Kaplan, B. E., Forman, S. J. (1993):
Ribozyme-mediated inhibition of bcr-abl gene expression in a Philadelphia chromosome-positive cell line.
Blood 82, 600-605
- Southby, J., Kissin, M. W., Danks, J. A., Hayman, J. A., Moseley, J. M., Henderson, M. A., Bennett, R. C., Martin, T. J. (1990):
Immunohistochemical localization of parathyroid hormone-related protein in human breast cancer.
Cancer Res. 50, 7710-7716
- Strewler, G. J., Stern, P. H., Jacobs, J. W., Eveloff, J., Klein, R. F., Leung, S. C., Rosenblatt, M., Nissenson, R. A. (1987):
Parathyroid hormonelike protein from human renal carcinoma cells. Structural and functional homology with parathyroid hormone.
J. Clin. Invest. 80, 1803-1807
- Taylor, N. R., Kaplan, B. E., Swiderski, P., Li, H., Rossi, J. J. (1992):
Chimeric DNA-RNA hammerhead ribozymes have enhanced in vitro catalytic efficiency and increased stability in vivo.
Nucleic Acids Res. 20, 4559-4565
- Turzynski, A., Struckhoff, G., Colangelo, D., Guidotto, S., Dietel, M. (1996):

Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) - a paracrine factor in astrocytes and an autocrine factor in astrocytomas.

In: Krisch, B., Mentlein, R., eds. The Peptidergic Neuron. Basel/Switzerland, Birkhäuser Verlag, 343-351

Tuschl, T., Eckstein, F. (1993):

Hammerhead ribozymes: importance of stem-loop II for activity.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6991-6994

Uhlenbeck, O. C. (1987):

A small catalytic oligoribonucleotide.

Nature 328, 596-600

Yang, J. H., Usman, N., Chartrand, P., Cedergren, R. (1992):

Minimum ribonucleotide requirement for catalysis by the RNA hammerhead domain.

Biochemistry 31, 5005-5009

Yasuda, T., Banville, D., Hendy, G. N., Goltzman, D. (1989):

Characterization of the human parathyroid hormone-like peptide gene. Functional and evolutionary aspects.

J. Biol. Chem. 264, 7720-7725

Eidesstattliche Versicherung

Belehrt über die Strafbarkeit einer auch nur fahrlässig falschen Versicherung an Eides Statt versichere ich an Eides Statt:

Ich heiße: Martin Schultz
geb. am: 27. September 1970
wohnhaft in: Sonntagstr. 19, 10245 Berlin

Ich versichere hiermit, dass ich die der Medizinischen Fakultät Charité vorgelegte Dissertationsschrift:

„Entwicklung eines metabolisch stabilen Ribozyms gegen die mRNA des Parathormonverwandten Proteins (PTHrP)“

selbstständig angefertigt habe, die Arbeit auch in Teilen keine Kopie anderer oder eigener Arbeiten darstellt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden.

Ich habe und hatte bisher kein Promotionsverfahren an anderen Stellen beantragt.

Mir ist bewusst, dass eine nicht wahrheitsgemäße eidesstattliche Versicherung erhebliche strafrechtliche Konsequenzen für mich haben kann.

Berlin, den 16.01.2001

Curriculum vitae

von

Martin Schultz

geboren am 27. September 1970 in Neubrandenburg

Familienstand: verheiratet, zwei Kinder

Schulbildung:

1977 – 1984 Polytechnische Oberschule in Neubrandenburg

1984 – 1989 Kinder- und Jugendsportschule „Werner Seelenbinder“ in Berlin

Erlangen der Hochschulreife: 29. Juni 1989

Berufsausbildung: Krankenpfleger

1989 – 1992 Berufliche Schule am Klinikum Neubrandenburg

Erlaubnis zur Führung der

Berufsbezeichnung Krankenpfleger: 01. September 1992

Studium: Humanmedizin

1992 - 2000 Humboldt-Universität zu Berlin

Promotion: am Institut für Pathologie – Universitätsklinikum Charité der Humboldt-Universität zu Berlin

Beginn der Promotion am 01. Juni 1996.

Betreuer: Prof. Dr. Dietel und Dr. Turzynski, Institut für Pathologie

Dritter Abschnitt der
Ärztlichen Prüfung:

5. Dezember 2000

Danksagung

An erster Stelle danke ich meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglichten.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dietel und Dr. Andreas Turzynski für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Sachmittel.

Besonders herzlich danke ich Dr. Andreas Turzynski für die intensive Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und für die Einführung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken.

Ebenfalls großen Dank zolle ich Dr. Sabine Müller, die mich mit gutem Rat und vor allem mit der Herstellung der Ribozyme unterstützte.

Des Weiteren danke ich meinem Kommilitonen Timm Schulz für die gute Zusammenarbeit und den regen Gedankenaustausch.

Ferner gilt mein Dank den Mitarbeitern des Pathologischen Instituts für ihre Unterstützung. Besonders nennen möchte ich hier Stefanie Wurr, Imad Kajjal, Dr. Gabriele Saretzki, Dr. Andreas Bunge, Dr. Kai Wiechen und Dr. Ursula Anderer.

Zuletzt, aber um so herzlicher danke ich meiner Frau Ulrike, die mich in allen Phasen der Arbeit unterstützt hat.